

DER NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN
GEGEN NAIROBI SHEEP DISEASE-VIRUS
MIT DER INDIREKTEN HÄMAGGLUTINATION
UND DEM INDIREKTEN
IMMUNOFLUORESZENZANTIKÖRPERTEST

Ein Vergleich mit einem Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay

Thomas Fritz

1982

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz

DER NACHWEIS VON
ANTIKÖRPERN GEGEN NAIROBI SHEEP DISEASE-VIRUS
MIT DER INDIREKTEN HÄMAGGLUTINATION
UND DEM INDIREKTEN IMMUNOFLUORESCENZANTIKÖRPERTEST
- EIN VERGLEICH MIT EINEM
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Thomas Fritz

aus

Mannheim

München 1982



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan
Referent: Prof. Dr. E. Munz
Korreferent: Prof. Dr. P.A. Bachmann

Tag der Promotion: 30. Juli 1982

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549025_0015

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Schrifttum</u>	2
2.1. Serologische Untersuchungen zum Nachweis von Antigen bzw. Antikörpern bei der NSD-Infektion	2
2.1.1. Serumneutralisationstest (SNT)	2
2.1.2. Komplementbindungsreaktion (KBR)	3
2.1.3. Agargelpräzipitation (AGP)	3
2.1.4. Direkte Hämagglutination (HA)	4
2.1.5. Direkte und indirekte Immunofluoreszenzmethoden	4
2.1.6. Indirekte Hämagglutination (IHA)	5
2.1.7. Kombinierte Anwendung verschiedener Methoden	6
2.2. Vergleichende serologische Untersuchungen bei Infektionen mit DNS-haltigen Viren	8
2.2.1. Familie Parvoviridae	8
2.2.2. Familie Adenoviridae	9
2.2.3. Familie Iridoviridae	10
2.2.4. Familie Herpetoviridae	11
2.2.5. Familie Poxviridae	17
2.3. Vergleichende serologische Untersuchungen bei Infektionen mit RNS-haltigen Viren	20
2.3.1. Familie Picornaviridae	20
2.3.2. Familie Reoviridae	22
2.3.3. Familie Togaviridae	26
2.3.4. Familie Orthomyxoviridae	30
2.3.5. Familie Paramyxoviridae	31
2.3.6. Familie Rhabdoviridae	32
2.3.7. Familie Coronaviridae	33
2.3.8. Familie Arenaviridae	35
2.3.9. Familie Retroviridae	36
2.4. Allgemeine Synopsis der vergleichenden serologischen Untersuchungen	39

	<u>Eigene Untersuchungen:</u>	Seite
3.	<u>Material und Methoden</u>	42
3.1.	NSD-Virusstämme	42
3.2.	Zellkulturen	42
3.2.1.	Schafnierzellen	42
3.2.2.	Babyhamsternieren-Zelllinie BHK 13	43
3.3.	NSD-Virusvermehrung	43
3.3.1.	Virusvermehrung in Zellkulturen	43
3.3.1.1.	Virusvermehrung in tertiären Schafnierzellen	43
3.3.1.2.	Virusvermehrung in der Zelllinie BHK 13	44
3.3.2.	Virusvermehrung in Saugmäusen	44
3.3.2.1.	Virustitrationen	44
3.3.2.2.	Gewinnung von NSDV-haltigen Gehirnsuspensionen	45
3.4.	Versuchstiere	45
3.4.1.	Schafe	45
3.4.1.1.	Schafe zur Gewinnung von Immunseren	45
3.4.1.2.	Schafe zur Gewinnung von Erythrozyten	46
3.4.2.	Kaninchen	46
3.4.3.	Mäuse	46
3.5.	Immunisierung der Versuchstiere	46
3.5.1.	Infektion von Schafen	46
3.5.2.	Immunisierung von Kaninchen	47
3.5.3.	Serumgewinnung von immunisierten Tieren	47
3.6.	Untersuchungsmaterial	48
3.6.1.	Aus Afrika stammende Schafseren	48
3.6.2.	Normalseren	48
3.6.3.	Humanseren	48
3.7.	Serologische Untersuchungsmethoden	49
3.7.1.	Indirekter Immunofluoreszenzantikörpertest (IFAT)	49
3.7.1.1.	Deckglasmethode	49
3.7.1.2.	Suspensionsmethode	49
3.7.1.2.1.	Antigenbeschichtung	49
3.7.1.2.2.	Färbung	50
3.7.1.2.3.	Antispeziesglobuline	50
3.7.1.2.4.	Auswertung	50
3.7.1.3.	Kontrollfärbungen	51
3.7.1.4.	NSDV-Antigennachweis im Saugmausgehirn	51

	Seite
3.7.2. Indirekte Hämagglutination (IHA)	52
3.7.2.1. Antigengewinnung	52
3.7.2.2. Erythrozyten	53
3.7.2.2.1. Gewinnung der Erythrozyten	53
3.7.2.2.2. Stabilisierung der Erythrozyten	53
3.7.2.2.3. Tanninbehandlung und Antigensensibilisierung der Erythrozyten	53
3.7.2.3. Serumvorbehandlung	54
3.7.2.4. Testdurchführung	54
3.7.2.5. Kontrollreaktionen	55
3.7.3. Indirekter Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	55
4. <u>Ergebnisse</u>	56
4.1. Virustitrationen	56
4.2. Symptomatik der NSD-Infektion	57
4.2.1. Saugmäuse	57
4.2.2. Schafe	57
4.3. Serologische Untersuchungen	58
4.3.1. IFAT	58
4.3.1.1. Antikörperrnachweis	58
4.3.1.1.1. Kontrollfärbungen	58
4.3.1.1.2. Immunseren von Kaninchen	59
4.3.1.1.3. Seren experimentell infizierter Schafe	59
4.3.1.1.4. Immunseren von Schafen aus Kenya	60
4.3.1.1.5. Aus Afrika stammende Schafseren	60
4.3.1.1.6. Humanserem	61
4.3.1.2. Antigennachweis	61
4.3.2. IHA	62
4.3.2.1. Kontrollreaktionen	62
4.3.2.2. Immunseren von Kaninchen	62
4.3.2.3. Seren experimentell infizierter Schafe	63
4.3.2.4. Immunseren von Schafen aus Kenya	63
4.3.2.5. Aus Afrika stammende Schafseren	63
4.3.2.6. Humanserem	63
4.3.3. ELISA (Angaben nach MEIER, 1982)	65
4.3.3.1. Immunseren von Kaninchen	65
4.3.3.2. Seren experimentell infizierter Schafe	65
4.3.3.3. Immunseren von Schafen aus Kenya	65

	Seite
4.3.3.4.	Aus Afrika stammende Schafseren 65
4.3.3.5.	Humanserren 66
4.3.4.	Vergleichende Beurteilung der serologischen Untersuchungsmethoden 67
4.3.4.1.	Immunserren von Kaninchen 67
4.3.4.2.	Seren experimentell infizierter Schafe 69
4.3.4.3.	Aus Afrika stammende Schafseren 73
4.3.4.4.	Humanserren 76
5.	<u>Diskussion</u> 77
6.	<u>Zusammenfassung</u> 89
	<u>Summary</u> 91
7.	<u>Literaturverzeichnis</u> 93
	Lebenslauf 109

ABKÜRZUNGEN

AGP	Agargelpräzipitation
BHK	Baby hamster kidney (Babyhamsternieren)
cpE	cytopathischer Effekt
DID	Doppelimmunodiffusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAT	direkter Immunofluoreszenzantikörpertest
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fKS	fetales Kälberserum
HA	direkte Hämagglutination
HAH	Hämagglutinationshemmung
i.c.	intracerebral
ID	Immunodiffusion
IEOP	Immunoelektroosmophorese
IFAT	indirekter Immunofluoreszenzantikörpertest
Ig	Immunglobulin
IHA	indirekte Hämagglutination
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IP	Immunoperoxidase
KBR	Komplementbindungsreaktion
LD ₅₀	letale Dosis für 50% der Versuchstiere
M	Medium
MEM	Minimal Essential Medium
NSD (V)	Nairobi Sheep Disease (-Virus)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
p.i.	post infectionem
PRT	Plaquereduktionstest
RID	radiale Immunodiffusion
s.c.	subkutan
SchN	Schafnieren
SMG	Saugmausgehirn
SNT	Serumneutralisationstest

1. EINLEITUNG

Die Nairobi Sheep Disease (NSD) ist eine durch ein Virus der Familie Bunyaviridae hervorgerufene und durch Schildzecken (hauptsächlich *Rhipicephalus appendiculatus*) übertragene hämorrhagische Gastroenteritis der kleinen Wiederkäuer in bestimmten Gebieten Ostafrikas.

Zum Nachweis des NSD-Virus (NSDV) bzw. seiner Antikörper und zur Überprüfung einer postinfektionellen bzw. postvakzinalen Immunität wurden bisher die Agargelpräzipitation, Komplementbindungsreaktion, indirekte Hämagglutination, der direkte und indirekte Immunofluoreszenzantikörpertest und der Serumneutralisationstest herangezogen. Die damit gemachten Erfahrungen sind jedoch unterschiedlich und lassen nur bedingt Rückschlüsse auf die Brauchbarkeit der einzelnen Verfahren zu, besonders auch im Hinblick auf ihre Eignung zur Durchführung epidemiologischer Untersuchungen.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es deshalb einmal, selbst hergestellte Immunsereen von Schafen und Kaninchen sowie aus Afrika stammende Schafsereen auf Antikörper gegen NSDV in der indirekten Hämagglutination und im indirekten Immunofluoreszenzantikörpertest zu überprüfen und die Anwendbarkeit dieser Tests für serologische Reihenuntersuchungen zu verbessern. Darüberhinaus galt es, die Ergebnisse mit denjenigen eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay zu vergleichen, der zeitlich parallel unter Verwendung gleicher Serumproben von anderer Seite ausgearbeitet wurde. Damit sollte eine Aussage ermöglicht werden über den Zeitaufwand und die Schwierigkeiten bei der Durchführung der einzelnen Testmethoden, über ihre Sensibilität und über die Eignung dieser drei Techniken für seroepidemiologische Untersuchungen.

2. SCHRIFTTUM

2.1. SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS VON ANTIGEN BZW. ANTIKÖRPERN BEI DER NSD-INFEKTION

2.1.1. Serumneutralisationstest (SNT)

ANSELL (1957) zeigte, daß in unverdünntem Serum immunisierter Schafe, das mit variierenden Virusdosen versetzt und Mäusen intracerebral appliziert wurde, Antikörper gegen NSDV nachgewiesen werden können. Der Autor verwendete diese Art des SNT zur Überprüfung des Immunstatus von Schafen, die mit attenuiertem NSDV vakziniert worden waren.

Anläßlich eines Ausbruchs von NSD in Entebbe, Uganda, führten WEINBREN und Mitarb. (1958) mit der gleichen Methodik epidemiologische Untersuchungen durch. Die Ergebnisse des SNT mit Immunseren gegen das Isolat aus Entebbe und ein NSDV- Isolat aus Kenya zeigten, daß zwischen beiden Isolaten antigene Differenzen nicht bestanden. In 23 von 81 Schaf- und Ziegenserem aus verschiedenen Gebieten Ugandas waren neutralisierende Antikörper nachweisbar. Diese Resultate deuteten bereits damals auf die Verbreitung der Infektion in Uganda hin.

Virusneutralisierende Antikörper in Seren immunisierter Schafe demonstrierte 1969 auch TERPSTRA mit einem auf sekundären Hamsternierenzellen durchgeführten SNT. Die Verwendung konstanter Virusdosen und variierender Serumverdünnungen wurde gegenüber der Technik von ANSELL (1957) und WEINBREN und Mitarb. (1958) bevorzugt, da die Ergebnisse besser in Einklang miteinander standen und weniger Verdünnungsstufen zur Titerbestimmung benötigt wurden. Die Höhe des SNT-Titers schien in Zusammenhang mit der erzielten Immunität zu stehen: mit Titern bis 1:2 starben alle Tiere nach einer Belastungsinfektion, während 4 von 5 Schafen mit Titern von 1:4 bis 1:8 überlebten. Bei Verwendung der Zelllinie "Baby hamster kidney (BHK) 21/13" war der Test weniger sensibel. Der Autor hielt deshalb diese Zelllinie zur Durchführung des SNT für ungeeignet.

DAVIES (1972) beschrieb neben einem Plaque-Test, der sich zur Titrierung des NSDV eignete, den entsprechenden Neutralisationstest (Plaquereduktionstest, PRT). Dieser wurde erfolgreich zum NSDV-Antikörpernachweis in Seren von Schafen aus Somalia angewendet. Ähnliche Ergebnisse erzielte

der herkömmliche Neutralisationstest im Röhrchentestsystem. Beide Verfahren wiesen jedoch eine relativ geringe Sensibilität auf.

2.1.2. Komplementbindungsreaktion (KBR)

TERPSTRA (1969) prüfte erstmals die Anwendbarkeit der KBR zum Antigen- bzw. Antikörpernachweis bei NSD. Eine positive Komplementbindung war mit Hyperimmunseren von Mäusen und aus infiziertem Mäusegehirn extrahiertem MSDV-Antigen demonstrierbar. Der negative Ausfall dieser Reaktion mit nichtinfiziertem Kontrollantigen bzw. Hyperimmunseren gegen andere in Ostafrika vorkommende Arboviren erwies die Spezifität der KBR. Virusisolate konnten mit der KBR als NSDV identifiziert werden. Auch zum Antikörpernachweis war die KBR geeignet. In Seren immunisierter Schafe und Ziegen traten komplementbindende Antikörper 10 bis 20 Tage post infectionem (p.i.) auf und erreichten schnell die höchsten Titer von 1:40 bis 1:160, fielen jedoch bereits 5 bis 8 Wochen p.i. wieder ab. Eine Zweitimmunisierung 5 Wochen p.i. führte nur zu einem geringen Antikörperanstieg. Aufgrund der kurzen Nachweisbarkeit komplementbindender Antikörper hielt TERPSTRA (1969) die KBR nicht für epidemiologische Untersuchungen geeignet. Der Wert der KBR wurde darin gesehen, einen Ausbruch der NSD durch den Nachweis des KBR-Titeranstieges in Serum-paaren, jeweils vom selben Tier in etwa zweiwöchentlichem Abstand entnommen, zu diagnostizieren.

2.1.3. Agargelpräzipitation (AGP)

Die AGP zeigte sich in den Untersuchungen von TERPSTRA (1969) ähnlich spezifisch wie die KBR und ist sowohl zum Antigen- als auch zum Antikörpernachweis geeignet. Die Titer von Mäusehyperimmunseren in der AGP waren jedoch 10 bis 80fach niedriger als die entsprechenden KBR-Titer. In den Seren vakzinierter Schafe und Ziegen traten präzipitierende Antikörper 4 bis 17 Tage p.i. auf und blieben mindestens 12 Monate demonstrierbar. Auch aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit empfahl der Autor die AGP für Felduntersuchungen.

Im Gegensatz dazu erzielten DAVIES, MUNGAI und TAYLOR (1977) mit der AGP keine befriedigenden Ergebnisse, da bei Verwendung von in BHK-Zellen vermehrtem Antigen neben einer weniger deutlichen spezifischen Präzipitationslinie stets auch unspezifische auftraten. Auch war es nicht möglich, präzipitierende Antikörper in Rekonvaleszentenserum von Schafen nachzuweisen.

2.1.4. Direkte Hämagglutination (HA)

Sowohl mit aus Mäusegehirn extrahiertem als auch mit Zellkultur-Antigen konnte TERPSTRA (1969) unter Verwendung von Erythrozyten verschiedener Spezies keine hämagglutinierenden Eigenschaften des NSDV feststellen. Änderungen der Reaktionstemperatur, des pH-Wertes sowie eine Vorbehandlung des Antigens mit dem Ziel, mögliche Hemmfaktoren zu beseitigen, führten nicht zum Erfolg. Die HA ist somit zum Nachweis des NSDV nicht brauchbar. Aus diesem Grund ist die Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH) nicht zur Demonstration NSDV-spezifischer Antikörper geeignet.

2.1.5. Direkte und Indirekte Immunofluoreszenz-Methoden

OHDER, LUND und WHITELAND (1970) gelang es erstmals, NSDV in infizierten BHK-Zellkulturen mittels des direkten Immunofluoreszenzantikörpertestes (fluorescent antibody technique, FAT) nachzuweisen. Aus Hyperimmunserum von Schafen wurde die Globulinfraction mit Ammoniumsulfat ausgefällt und mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Die Autoren konnten mit dieser Methode die Vermehrung des Virus gut verfolgen. Hell gefärbte Bereiche traten im Zytoplasma erstmals 12 Stunden p.i. auf; 18 Stunden p.i. war spezifische Fluoreszenz demonstrierbar und 84 Stunden p.i. zeigten etwa 90 % der Zellen eine Fluoreszenz. Parallel durchgeführte Titrations wiesen jedoch auf eine schneller ablaufende Virusvermehrung hin: sie erreichte ihr Maximum bereits vor demjenigen der Immunofluoreszenz.

DAVIES, MUNGAI und TAYLOR (1977) verwendeten bei der direkten Technik die Immunoglobuline (Ig) aus Hyperimmunserum von Kaninchen und aus Bauchhöhlenflüssigkeit von mehrmals intraperitoneal (i.p.) immunisierten

Mäusen, die mit Natriumsulfat ausgefällt und wiederum mit FITC markiert wurden. Beim indirekten Immunofluoreszenzantikörpertest (indirect fluorescent antibody technique, IFAT) überschichteten die Autoren das Antigen zuerst mit nichtmarkiertem Antiserum und in einem zweiten Reaktionsschritt mit FITC-konjugiertem Antispeziesglobulin. Zu diesem Zweck stellten DAVIES, MUNGAI und TAYLOR (1977) gegen Schafglobulin gerichtete Antikörper in Kaninchen her und gewannen diese ebenfalls durch Ausfällung mit Natriumsulfat. Ein FITC-konjugiertes Antimausglobulin wurde kommerziell bezogen. Sowohl mit dem direkten als auch mit dem indirekten Immunofluoreszenztest war das NSDV zwar in Gefrierschnitten und Abklatschpräparaten infizierter Organe demonstrierbar, jedoch war diese Technik zu aufwendig, um als Routinemethode Anwendung finden zu können. Als schnellstes Nachweisverfahren stellte sich die Inokulation von BHK-Zellkulturen mit Suspensionen infizierter Organe heraus, wobei das NSDV anschließend durch den FAT oder IFAT identifiziert wurde. Die Ergebnisse waren nach 24 bis 48 Stunden verfügbar und nicht von der Ausbildung eines zytopathischen Effektes (cpE) abhängig. Etwas sensibler, aber zeitaufwendiger war die Isolierung des NSDV in Mausgehirn und Identifikation des Virus mit dem FAT oder der KBR. Diese Methode wurde von den Autoren für den Fall empfohlen, daß keine Möglichkeit zur Züchtung von Zellkulturen besteht.

2.1.6. Indirekte Hämagglutination (IHA)

Bei der indirekten Hämagglutination (IHA) werden Erythrozyten, an deren Oberfläche das Antigen gekoppelt ist, als Indikatorsystem für eine Antigen-Antikörperreaktion benutzt. In Anwesenheit von spezifischen Antikörpern werden die Erythrozyten netzartig agglutiniert, während es im anderen Fall zu einer knopförmigen Sedimentation der Blutkörperchen kommt.

Die Technik der IHA zum Nachweis von NSDV-Antikörpern wurde erstmals von JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976) beschrieben. Die Autoren koppelten NSDV-Antigen, das aus infizierten Zellkulturen mittels einer Polyethylenglykol (PEG)-Fällung gewonnen wurde, an frische, nicht stabilisierte Schaferythrozyten. Sie fanden im Vergleich dieses Verfahrens mit dem in der Serumverdünnungsstufe 1:10 durchgeführten IFAT eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Von 17 Schaf- und 26 Ziegenserum waren 6 Seren mit einem

IHA-Titer $\leq 1:80$ im IFAT negativ. Alle anderen Seren wurden in beiden Testverfahren positiv beurteilt. 12 Seren erreichten IHA-Titer von 1:80 bis 1:320, 13 Seren einen solchen von 1:640 bis 1:2560 und 14 Seren zeigten Titer von 1:5120 bis 1:40960. Die Autoren beurteilten die IHA somit als sehr sensible Nachweismethode für Antikörper gegen das NSDV. Sie begründeten die Spezifität des Testes mit dem negativen Ausfall von Kreuzreaktionen mit Antiseren gegen andere Arboviren.

Mit der IHA führte JESSETT (1978) erstmals größere seroepidemiologische Untersuchungen über die Verbreitung der NSD durch. Er prüfte insgesamt 1737 Schaf- und Ziegenserum auf das Vorkommen von Antikörpern gegen das NSDV in Tanzania. Titer von $\geq 1:160$ wurden als positive Reaktion gewertet. Antikörperhaltige Seren fand der Autor in den meisten Gegenden Tanzanias, erwartungsgemäß mit besonderer Häufigkeit in solchen Gegenden, in denen das Vorkommen des Vektors der NSD feststand. Dort zeigten 29,2 % der geprüften Seren positive Titer, während in Gegenden, in denen *Rhipicephalus appendiculatus* selten oder überhaupt nicht vorhanden war, nur 3,2 % der Seren spezifische Antikörper aufwiesen.

2.1.7. Kombinierte Anwendung verschiedener Methoden

EDELSTEN (1975) untersuchte, ob die NSD im "Zeckenfieberkomplex", der für hohe Verluste in Schaf- und Ziegenbeständen Somalias verantwortlich war, eine Rolle spielte. Der Autor fand, daß Infektionen mit NSDV daran zu über 90 % beteiligt waren. Bei 22 von 29 untersuchten Tieren gelang die Virusisolation. Spezifische Antikörper waren mittels PRT, IFAT und IHA in 103 von 224 geprüften Seren nachweisbar.

DAVIES, JESSETT und OTIENO (1976) verfolgten den Antikörperverlauf bei Schafen über einen Zeitraum von 15 Monaten. Sie benutzten dazu die IHA, KBR, den IFAT und den SNT. Die Infektion der Schafe erfolgte mit dem virulenten Virusstamm I 34, dem Isolat eines Krankheitsausbruches bei Wollschafen. Die Seren von 7 Schafen wurden in monatlichen Abständen auf ihren Antikörpergehalt hin untersucht. In der KBR trat der höchste Titer von 1:256 einen Monat p.i. auf. Anschließend zeigte sich ein Abfall des Antikörperspiegels über 8 Monate hinweg. 9 Monate p.i. war eines der

Seren in der KBR negativ und 15 Monate p.i. ließen sich mit dieser Methode bereits in 3 der 7 Seren keine Antikörper mehr feststellen. Auch im IFAT war der höchste Titer von 1:10240 einen Monat p.i. nachweisbar. Der Titerabfall war hier jedoch nicht so ausgeprägt wie in der KBR; es war über den gesamten Zeitraum von 15 Monaten p.i. spezifische Fluoreszenz demonstrierbar. In der IHA betrug der höchste Titer 1:20480 einen Monat p.i.. Der Antikörperspiegel blieb nach leichtem Absinken nahezu konstant. Der SNT wurde mit variierender Virusdosis auf Saugmäusen und mit verschiedenen Serumverdünnungen auf BHK-Zellen durchgeführt. Da sich nur einen Monat p.i. ein höherer SNT-Titer als vor der Infektion ergab, hielten die Autoren den SNT für den Nachweis von Antikörpern gegen das NSDV für nicht brauchbar. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die KBR, die IHA und der IFAT zum Antikörpernachweis gut geeignet sind. Die IHA und der IFAT erwiesen sich dabei als sensibler als die KBR.

Die gleichen serologischen Methoden benutzten DAVIES, OTIENO und JESSETT (1977), um die Antikörperbildung von Schafen nach der Verabreichung verschiedener NSD-Vakzinen zu überprüfen. Sie verwendeten einen inaktivierten, mit Methanol präzipitierten Impfstoff und zwei attenuierte Vakzinen. Die Virulenzabschwächung des Virus erfolgte hierbei durch 34 Mausgehirn- bzw. 74 BHK-Zellpassagen. Bei der Überprüfung der Immunantwort auf diese Impfstoffe zeigten sich wiederum die KBR, die IHA und der IFAT als brauchbar. Die niedrigeren Antikörpertiter derjenigen Tiere, die mit einer der attenuierten Vakzinen immunisiert worden waren, gingen mit einem nicht ausreichenden Infektionsschutz einher. Es traten im Gegensatz zu der Tiergruppe, die mit der inaktivierten Vakzine geimpft worden war, bei der Belastungsinfektion mit virulentem NSDV Krankheitserscheinungen auf.

DAVIES (1978) untersuchte das Antikörpervorkommen gegen das NSDV bei Schafen und Ziegen in Kenya in Beziehung zur Verbreitung des Vektors und darüber hinaus Seren einiger wildlebender Wiederkäuer (Impala, Giraffe, Thomson Gazelle u.a.) und von Ratten. Auch in dieser Untersuchung fanden die KBR, die IHA und der IFAT Anwendung. Die geographische Verbreitung der Tiere, in deren Seren Antikörper nachweisbar waren, stimmte mit derjenigen von *Rhipicephalus appendiculatus* überein. Die Ergebnisse der Seren verschiedener Rattenspezies zeigten, daß diese Tiere nicht als

Reservoir des NSDV in Frage kommen. Es wurde kein positives Ratten-serum gefunden. In einer geringen Anzahl von Seren einiger Wildwiederkäuer waren Antikörper fluoreszenzserologisch nachweisbar, jedoch nur mit Titern von 1:10 bis 1:20, während Schafseren bis zu 1:10240 Fluoreszenz zeigten. Auch war die Intensität der Fluoreszenz geringer als bei Kontrollfärbungen mit positiven Schafseren. Diese Wildtiserseren wurden auch in der KBR und der IHA getestet, wobei es in der KBR überhaupt zu keinen positiven Reaktionen kam und mit der IHA lediglich relativ niedrige Titer bis 1:320 festzustellen waren. Der Autor erklärte diese Ergebnisse mit der Möglichkeit eines früheren Kontaktes der Wildtiere mit NSDV bzw. - da kein hochtitriges Serum gefunden wurde - mit Kreuzreaktionen, die auf Infektionen mit anderen Bunyaviren zurückzuführen sind.

2.2. VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN BEI INFektionen MIT DNS-HALTIGEN VIREN

2.2.1. FAMILIE PARVOVIRIDAE

GENUS PARVOVIRUS

HINAIDY (1980) untersuchte 31 Kälberseren mittels KBR und SNT auf Antikörper gegen bovine Parvoviren (BPV). Eine Modifizierung der KBR bestand darin, daß dem Meerschweinchenkomplement 1 % aktives antikörperfreies Kälberserum zugesetzt wurde. Die Testseren stammten von Tieren, bei denen das Vorkommen von BPV durch Virusisolation gesichert war. Der SNT erwies sich als das etwas sensiblere Verfahren. Von 25 Seren, die in der KBR positiv reagierten, zeigten 24 auch eine spezifische Neutralisation. Zusätzlich wiesen 6 Seren neutralisierende Antikörper auf, die in der KBR negativ beurteilt wurden. Die mit den beiden Methoden gefundenen Titer korrelierten recht gut miteinander. Antikörper ließen sich mit dem SNT in Serumverdünnungen von $\geq 1:2048$ und mit der KBR von $\geq 1:128$ nachweisen. Die Autorin untersuchte ferner 18 Rinderseren nach verschiedenen Vorbehandlungen zur Beseitigung unspezifischer Seruminhhibitoren mit der HAH auf Antikörper gegen BPV. Die Ergebnisse dieses Verfahrens konnten jedoch nicht zufriedenstellen;

sie erwiesen sich als schlecht reproduzierbar und standen in keiner Relation zu den Ergebnissen eines zum Vergleich durchgeführten SNT. Dagegen zeigte sich die HAH mit Hyperimmunseren von Kaninchen als durchaus brauchbar, sodaß die Autorin eine Speziesabhängigkeit der Ergebnisse in der HAH mit BPV feststellte. Während die HAH somit zur Virusidentifikation mittels Kaninchenhyperimmunseren geeignet war, stellten sich die KBR und der SNT als einfache und reproduzierbare Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen BPV heraus.

2.2.2. FAMILIE ADENOVIRIDAE

GENUS MASTADENOVIRUS

Vergleichende Untersuchungen über die Sensibilität und Spezifität des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Bezug auf die im SNT erzielten Ergebnisse zum Nachweis von Antikörpern gegen bei Hunden vorkommende Adenoviren führten NOON und Mitarb. (1979, durch. Sie infizierten je eine Gruppe von hunden mit caninem Adenovirus Typ 2 bzw. einer attenuierten Lebendvaccine gegen Hepatitis contagiosa canis (HCC). Homologe Antikörper waren mit beiden Testverfahren zu einem früheren Zeitpunkt und in höheren Serumverdünnungen nachweisbar als heterologe Antikörper. In Immunseren gegen HCC-Virus konnten die höchsten Titer homologer Antikörper von je 1:320 im ELISA und SNT ab dem 21. Tag p.i. gefunden werden; kreuzreagierende Antikörper gegen das canine Adenovirus Typ 2 traten im ELISA bis 1:20 und im SNT bis 1:40 auf. Bei der Untersuchung der Immunseren gegen diesen Erreger zeigte sich der SNT beim Nachweis von homologen Antikörpern mit einem Titer von 1:320 gegenüber 1:160 und von heterologen Antikörpern mit 1:80 gegenüber 1:40 dem ELISA überlegen.

Eine 98 %ige Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden fanden die Autoren beim Nachweis von Antikörpern gegen das HCCV in 224 Hundeseren. Im ELISA und SNT positive Resultate erbrachten 125 Seren und jeweils negativ fielen 95 Seren aus. Dagegen wurden 3 Seren im ELISA negativ und im SNT positiv beurteilt; nur ein Serum reagierte umgekehrt im ELISA positiv und im SNT negativ. Die höchsten Antikörpertiter betrugen im ELISA 1:1280 und im SNT $\geq$ 1:1280. Der SNT zeigte sich mit einem

geometrischen Mittelwert der Titer von 1:44 dem ELISA mit 1:39 überlegen. Bezogen auf die Ergebnisse des SNT betrug die Sensibilität des ELISA (Bestätigung der positiven Beurteilungen) 98 % und seine Spezifität (Bestätigung der negativen Beurteilungen) 99 %. Die Autoren schlossen daraus, daß mit beiden Testverfahren dieselben oder ähnliche Antikörper nachgewiesen werden. Sie hielten den ELISA für geeignet, bei der Bestimmung des Immunstatus von Hunden gegen die HCC den SNT zu ersetzen: seine Vorteile lägen in der Ersparnis von Arbeit, Zeit und Laborausstattung.

2.2.3. FAMILIE IRIDOVIRIDAE

PAN und Mitarb. (1974) untersuchten die Seren von 571 Schweinen in Spanien auf Antikörper gegen das Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASPV). Von den 4 verwendeten Nachweismethoden hatten 3 eine vergleichbare Sensibilität: Die Immunoelektrosmophorese (IEOP), die radiale Immunodiffusion (RID) und der IFAT wiesen 89, 85 bzw. 83 % der insgesamt gefundenen Reagenten nach. Die AGP hatte mit 55 % eine deutlich geringere Empfindlichkeit. Nur die RID war aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit dazu geeignet, unter Feldbedingungen zur Schnelldiagnose der Infektion eingesetzt zu werden.

WARDLEY und Mitarb. (1979) führten eine vergleichende Untersuchung über den Antikörpernachweis gegen das ASPV mit dem ELISA, der KBR und der IEOP durch. Der ELISA erwies sich bei der Prüfung von Seren 10 experimentell infizierter Schweine um mindestens 10fach sensibler als die beiden anderen Verfahren. Große Bedeutung wurde dem ELISA von den Autoren auch deshalb zugemessen, weil die lange Haltbarkeit der konjugierten Antikörper eine Diagnose auch in minimal ausgestatteten Feldlaboratorien erlaube.

Die große Sensibilität des ELISA bestätigten HAMDY und DARDIRI (1979), die 23 Schweineseren mittels ELISA, IEOP und IFAT auf Antikörper gegen das ASPV untersuchten. Die Tiere waren mit einem Virusisolat aus Brasilien bzw. der Dominikanischen Republik infiziert worden. In allen Seren waren nur mit dem ELISA spezifische Antikörper nachweisbar. Die Titer lagen zwischen 1:640 und 1:2560. Negative Ergebnisse mit 55 Schweinenormalseren

und 19 heterologen Antiseren wiesen die Spezifität des ELISA nach. Diesen Untersuchungen kommt insofern eine besondere Bedeutung zu, weil die Virusisolate aus Süd- und Mittelamerika oft weniger virulent zu sein scheinen als diejenigen anderer Länder.

Bei ebenfalls experimentell infizierten Schweinen kamen die gleichen Autoren (HAMDY und DARDIRI, 1981) jedoch zu anderen Befunden. Hier zeigte der IFAT in einem auf 30 Seren begrenzten Vergleich zwar mit dem ELISA vergleichbare Ergebnisse, die ELISA-Titer waren aber bis zu 100fach höher als die entsprechenden IFAT-Titer.

HAMDY und Mitarb. (1981) erprobten den ELISA unter Feldbedingungen in der Dominikanischen Republik. Nur in 12 von 224 ELISA-positiven Seren waren mit dem IFAT Antikörper gegen das ASPV nachweisbar. Andererseits wurden 426 ELISA-negative Seren auch im IFAT negativ beurteilt. Beim Titervergleich in übereinstimmend positiv eingestuften Seren stellte sich der ELISA als 3 bis 200fach sensibler heraus. Während mit dem IFAT Antikörpertiter von 1:8 bis 1:512 gefunden wurden, lagen diejenigen des ELISA zwischen 1:400 und 1:6400. Aus diesem Grund führten die Autoren einen Teil der negativen IFAT-Ergebnisse in ELISA-positiven Seren auf seine geringere Empfindlichkeit zurück. Auf der anderen Seite traten bei mangelnder Serumqualität - etwa die Hälfte der Seren wies Hämolyse oder mikrobielle Verunreinigung auf - offensichtlich unspezifische Reaktionen im ELISA auf, die falsch positive Beurteilungen bedingten. Die Autoren glaubten, daß die Zuverlässigkeit des ELISA mit einer besseren Serumqualität ansteigt. Sie empfahlen diesen Test für die Untersuchung großer Anzahlen von Seren und die Überprüfung positiver Ergebnisse im IFAT.

2.2.4. FAMILIE HERPETOVIRIDAE

PETZOLDT, LINDEMANN und MERKT (1966) untersuchten mit der KBR und dem SNT 287 Seren von Zuchtpferden aus Nordwestdeutschland auf Antikörper gegen das Rhinopneumonitisvirus der Pferde. In 241 Seren waren neutralisierende und in 100 Seren komplementbindende Antikörper demonstrierbar, sodaß auf einen hohen Durchseuchungsgrad der Pferdezuchtbestände geschlossen werden konnte. Die unterschiedliche Anzahl der Reagenten in den beiden

Tests führten die Autoren auf eine längere Nachweisbarkeit der Antikörper im SNT gegenüber der KBR zurück. Das Vorliegen positiver KBR-Ergebnisse ließ somit eher eine akute Infektion vermuten als ein positives SNT-Resultat. ZYAMBO und Mitarb. (1973) verglichen die IHA mit dem SNT, der Standardmethode zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis / Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IBR/IPV). Über einen Zeitraum von 12 Monaten hinweg wurden Serumproben von 12 infizierten Färsen auf spezifische Antikörper untersucht. Nur in einer von insgesamt 120 Serumproben ergab sich ein differierendes Ergebnis, da das betreffende Serum einen IHA-Titer von 1:32, jedoch keinen Neutralisationstiter aufwies. In 119 Proben wurden mit beiden Testverfahren übereinstimmend positive bzw. negative Ergebnisse gefunden, wobei nur bei 3 Serumproben der Titer im SNT genauso hoch oder höher als in der IHA war. Bei einem Tier ließen sich über das ganze Jahr hinweg trotz des Auftretens vaginaler Läsionen keine Antikörper nachweisen. Bei den anderen Tieren zeigten sich in beiden Tests erhebliche Schwankungen im Antikörperverschmelz. Bei Titern von maximal 1:4096 in der IHA und 1:384 im SNT waren die im IHA erzielten im Mittel 7fach höher als im SNT, es ergab sich jedoch keine quantitative Korrelation der Titer für die einzelnen Serumproben. Trotzdem bezeichneten die Autoren die IHA als befriedigendes Nachweisverfahren für Antikörper gegen das IBR/IPV-Virus (IBRV) und beurteilten sie als sensibler, sowie schneller und leichter durchführbar als den SNT.

Eine bessere Korrelation der Antikörpertiter fanden ASSAF und Mitarb. (1975) zwischen dem IFAT und dem SNT. Sie untersuchten 28 Rinderseren auf Antikörper gegen das IBRV. Der IFAT stellte sich als brauchbare Alternativmethode für den SNT heraus, da er sich als etwa genauso sensibel wie der SNT erwies und die gefundenen Antikörpertiter der beiden Verfahren eine enge Beziehung zueinander aufwiesen. Im SNT betrug der höchste Titer 1:128 und im IFAT 1:256. Es war notwendig, den IFAT auf Kaninchennierenzellen anstelle von Kälberhodenzellen durchzuführen, um eine unspezifische Fluoreszenz zu vermeiden. Der IFAT benötigte weniger Zeit als der SNT und hatte den arbeitstechnisch großen Vorteil, daß die infizierten Zellkulturen monatelang bis zur Färbung aufbewahrt werden konnten.

Mehrere Autoren prüften Rinderseren vergleichend mit dem ELISA und dem SNT auf Antikörper gegen das IBRV.

PAYMENT und Mitarb. (1979) fanden mit beiden Tests in Serumpaaren einer kleineren Versuchsgruppe IBR-verdächtiger Rinder jeweils gleichbleibende bzw. ansteigende Titer. Die Untersuchung von 250 Rinderseren auf spezifische Antikörper erbrachte folgende Ergebnisse: bei 195 Seren korrelierten die Befunde, wobei in 49 Seren mit beiden Verfahren keine Antikörper gefunden wurden und 146 Seren im ELISA mit Titern bis $\geq 1:2560$ bzw. im SNT bis $\geq 1:128$ positiv reagierten. Nur ein Serum war im ELISA negativ und im SNT positiv, während 54 Seren keine Neutralisation zeigten, aber im ELISA Titer zwischen 1:10 und 1:640 erzielten. Dies bewies die größere Empfindlichkeit des ELISA besonders zum Nachweis niedriger Antikörperspiegel. Daneben waren die ELISA-Titer der meisten Seren 5 bis 20fach, bei einigen Seren sogar mehr als 100fach höher als die entsprechenden SNT-Titer. Für die Autoren lag die Folgerung nahe, daß der ELISA andere Antikörper mißt als der SNT, und sie beurteilten den ELISA als billiges, zeitsparendes und zur schnellen Untersuchung einer großen Anzahl von Seren geeignetes Verfahren. Gleichlautende Erfahrungen machten HERRING, NETTLETON und BURRELLS (1980). 58 von 163 der von ihnen untersuchten Rinderseren zeigten neutralisierende Antikörper mit Titern bis $\geq 1:128$ und wurden auch im ELISA positiv beurteilt. Zusätzlich ergaben 3 der SNT-negativen Seren im ELISA gering positive Ergebnisse. Die Autoren bezeichneten den ELISA somit als zumindest genauso empfindlich wie den SNT, jedoch als schneller und bequemer in der Durchführung.

BOMMELI und Mitarb. (1980) wiesen in 96 von 166 Rinderseren neutralisierende Antikörper mit Titern bis 1:203 nach. 93 dieser Seren wurden auch im ELISA positiv beurteilt, sodaß der ELISA im Vergleich zum SNT eine Sensibilität von 97 % erreichte. Die Autoren hielten den ELISA jedoch für genauso sensibel, da andere virushemmende Faktoren einen Neutralisationseffekt vortäuschen könnten. Auch BOMMELI und Mitarb. (1980) sahen den Vorteil des ELISA in seiner einfachen und schnellen Durchführbarkeit.

LUGOVIC und CVETNIC (1980) demonstrierten Antikörper gegen das IBRV mittels der IHA und verglichen die Ergebnisse mit denjenigen des SNT. Sie untersuchten die Seren von 194 Kälbern, die mit einer IBR-Vakzine geimpft worden waren. 19,1 % der Seren zeigten weder in der IHA noch im SNT Antikörper. Von den positiven Seren hatten lediglich 10,9 %

in der IHA einen niedrigeren Titer als im SNT. Bei 26,8 % waren die in beiden Verfahren erzielten Titer gleich hoch. In allen anderen Seren erzielte die IHA höhere Titer als der SNT, in der Mehrzahl (45,9%) um 2 Stufen. Die IHA erwies sich als zeitsparendes und billiges Nachweisverfahren für Antikörper gegen das IBRV und war einfacher durchführbar als der SNT.

Die Brauchbarkeit des IFAT und der Immunoperoxidasetechnik (IP) für den Antikörpernachweis gegen das Virus des Bösaartigen Katarrhalfiebers (BKF) (afrikanische Form) untersuchte ROSSITER (1980) anhand von Kaninchenhyperimmunseren. Zur Markierung des Immunglobulins G (Ig G) in der IP diente Meerrettichperoxidase. Der Autor bezeichnete die IP als zuverlässige Methode zur serologischen Diagnose des BKF. Sie war etwa 4fach sensibler als der IFAT, den der Autor jedoch wegen seiner Sparsamkeit für experimentelle Untersuchungen und zur Prüfung einer größeren Anzahl von Seren empfahl.

In einer neuen Untersuchung konnte ROSSITER (1981) zeigen, daß beide Verfahren auch zum Antikörpernachweis in den Seren natürlich bzw. experimentell infizierter Rinder geeignet waren. Hierbei stellte sich erneut die größere Sensibilität der IP heraus: die mit diesem Test erzielten Titer waren etwa 8fach höher als diejenigen im IFAT und der Antikörpernachweis gelang mit der IP in 23 Seren klinisch des BKF verdächtiger Rinder, während mit dem IFAT nur in 19 Seren spezifische Antikörper demonstrierbar waren. Der Autor betrachtete deshalb die IP trotz des gegenüber dem IFAT größeren Arbeitsaufwandes als Methode der Wahl.

SKODA und JAKUBIK (1972) benutzten die KBR und den SNT zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Aujeszky'schen Krankheit (AV). Die KBR stellte sich als durchaus geeignetes Verfahren heraus. Ihre Spezifität war gesichert, da sowohl hämolysefördernde Aktivitäten der untersuchten Schweineseren als auch unspezifische Reaktionen nur in niedrigeren Titerstufen vorhanden waren als die spezifischen komplementbindenden Antikörper. Somit war nur die Beurteilung niedriger KBR-Titer gestört. Die Autoren betonten jedoch, daß bei der Untersuchung von Seren natürlich infizierter Schweine eine Beseitigung des Prozone-Effektes notwendig sein könne, da hier relativ niedrige KBR-Titer zu erwarten seien. In den Seren

infizierter Schweine erreichten die komplementbindenden Antikörper bereits 2 bis 4 Wochen p.i. die höchsten Titer, während die neutralisierenden Antikörper bis zur 5. Woche p.i. anstiegen. Nach Hyperimmunisierung der Schweine erfolgte in beiden Tests ein schneller Anstieg des Antikörperspiegels, wobei der SNT 2fach höhere Titer erreichte als die KBR. Die Möglichkeit des Antikörpernachweises mit dem IFAT im Vergleich zum SNT prüften WIRAHADIREDDA und PONDHUIS (1976). Sie untersuchten 261 Schweineseren auf Antikörper gegen das AV. Es ergab sich keine gute Korrelation der Titer. Dies erklärten die Autoren damit, daß beide Verfahren gegen verschiedene Antigene gerichtete Antikörper messen. Der IFAT erwies sich als die schnellere Nachweismethode und erzielte mit $\geq 1:512$ höhere Titer als der SNT mit $\geq 1:64$. Titer unter 1:32 im IFAT wurden als unspezifische Reaktion angesehen, da sie auch bei Tieren nachgewiesen wurden, die keinen Kontakt mit dem AV hatten. Deshalb konnten viele positive Neutralisationsergebnisse mit Titern unter 1:2 nicht im IFAT bestätigt werden. Die Autoren sahen dennoch die Neutralisation durch ein unverdünntes oder in niedrigen Stufen verdünntes Serum als Beweis für einen Kontakt mit dem AV an.

BITSCH und ESKILDSEN (1976) benutzten den SNT und die KBR zum Nachweis von Antikörpern gegen das AV in Schweineseren. Sie untersuchten insgesamt 398 Seren, wobei Übereinstimmend 312 Seren positiv und 78 negativ beurteilt wurden. Nur bei 8 Seren ergaben die Tests divergierende Ergebnisse: 5 in der KBR positive Seren zeigten keine Neutralisation und 3 Seren mit neutralisierenden Antikörpern fielen in der KBR negativ aus oder waren nicht auswertbar. Diese Übereinstimmung könnte nach Ansicht der Autoren bedeuten, daß mit beiden Verfahren dieselben Antikörper gemessen werden.

GUTEKUNST, PIRTLE und MENGELING (1978) fanden eine enge Übereinstimmung der Ergebnisse des SNT und der Immunodiffusion (ID). Von 2293 geprüften Seren wurden 419 im SNT mit Titern von $\geq 1:4$ bis 1:256 positiv beurteilt. 421 Seren ergaben in der ID ein positives Ergebnis. Von 52 Seren mit einem SNT-Titer von 1:4 waren 36 und von 53 Seren mit 1:8 50 in der ID positiv. Alle SNT-Titer von $\geq 1:16$ in 314 Seren wurden durch positive ID-Ergebnisse bestätigt. Zusätzlich waren 8 Seren mit einem SNT-Titer unter 1:4 und 13 von 71 Seren, die wegen Zytotoxizität, Hämolyse oder Kontamination im SNT nicht geprüft werden konnten, in der ID positiv.

Die ID erwies sich damit als sensible Nachweismethode für Antikörper gegen das AV und hatte gegenüber dem SNT den Vorteil, weniger zeitaufwendig zu sein, geringere Ansprüche an die Laborausstattung zu stellen und zytotoxische, hämolytische und kontaminierte Seren nicht von der Untersuchung auszuschließen.

Als erste führten MOUTOU, TOMA und FORTIER (1978) den ELISA zur Serodiagnose der Aujeszky'schen Erkrankung ein. Im Vergleich mit dem SNT stellte sich der ELISA als sensibleres, reproduzierbareres und weniger zeitaufwendiges Verfahren heraus. So wies ein im SNT negatives Serum einen Titer von 1:512 im ELISA auf. Ebenso zeigte die Untersuchung des Antikörperverschlusses bei 22 mit AV infizierten Schweinen die höhere Sensibilität des ELISA, dessen Titer eng mit denjenigen des SNT korrelierten. 34 Seren von Tieren aus gesunden Beständen, die keine neutralisierende Aktivität aufwiesen, fielen auch im ELISA negativ aus. Damit war auch die Spezifität des ELISA nachgewiesen. Eine größere Sensibilität des ELISA im Vergleich zum IFAT und SNT fanden auch BRIAIRE und Mitarb. (1979). Sie untersuchten den Antikörperverschluss bei geimpften bzw. intranasal mit AV infizierten Tieren. Von 200 Schweineseren, die vergleichend mit dem ELISA und dem SNT geprüft wurden, reagierten 130 in beiden Tests positiv und 2 Seren jeweils negativ. 64 Seren, die im ELISA Antikörper gezeigt hatten, wurden im SNT negativ beurteilt. Nach der Verlängerung der Inkubationszeit des SNT von 1 auf 24 Stunden, wie von BITSCH und ESKILDSEN (1976) beschrieben, fielen 13 dieser Seren im SNT positiv aus. Dennoch war der ELISA sensibler als der SNT. Nur ein ELISA-negatives Serum ergab im SNT mit verlängerter Inkubationszeit ein positives Ergebnis.

Eine weitestgehende Übereinstimmung der Ergebnisse des ELISA im Vergleich mit denjenigen des SNT fanden FORSCHNER und Mitarb. (1981). Zwei Ziele wurden mit den Untersuchungen verfolgt: Bestätigung einer positiven Beurteilung durch den anderen Test einerseits und Feststellung einer Korrelation der in beiden Verfahren erzielten Antikörpertiter andererseits. Demgemäß wurden insgesamt 769 Serumproben in 2 Gruppen eingeteilt. 306 Seren aus Aujeszky-verseuchten Beständen wurden ohne Austitrierung des Antikörpergehaltes bis zur Verdünnungsstufe 1:160 im ELISA bzw. 1:16 im SNT untersucht, um zu einer positiven oder negativen Beurteilung eines Serums zu gelangen. 155 Seren wurden mit beiden Methoden negativ und 149 jeweils positiv beurteilt. 2 Seren

waren im ELISA negativ, zeigten jedoch bei der Verdünnungsstufe 1:2 Neutralisation. Bei 463 Seren wurde der Antikörpertiter ermittelt. Die höchsten Titer betrugen 1:40960 im ELISA und 1:80 im SNT. Zwischen den Titern beider Verfahren bestand eine positive Korrelation. Auch in dieser Gruppe waren 2 Seren bei einem SNT-Titer von 1:2 im ELISA negativ. Umgekehrt wurden 17 Seren, die keine neutralisierende Aktivität aufwiesen, im ELISA positiv beurteilt; insgesamt wurde jedoch eine sehr große Übereinstimmung der positiven Beurteilungen erzielt. Die Ausnahmen lagen an den unteren Sensibilitätsgrenzen der Tests. Aus diesem Grund schlugen die Autoren für einen Titer von 1:2 im SNT bzw. 1:20 im ELISA ein besonderes Beurteilungssystem vor. Das betreffende Serum sollte als "zweifelhaft" eingestuft werden und eine endgültige Beurteilung nach einer Zweituntersuchung in einem gewissen Zeitabstand erfolgen. Bei erneut zweifelhaftem oder niedrigerem Titer wäre das Tier dann als nicht infiziert zu betrachten, während bei ansteigendem Titer eine Infektion anzunehmen wäre. Die Vorteile des ELISA gegenüber dem SNT sahen die Autoren in seinem geringeren Zeit- und Investitionsaufwand. Außerdem stellte der ELISA geringere Ansprüche an die Probenqualität, sodaß auch hämolytische Seren und Vollblut im ELISA untersucht werden konnten. Die Titer bei Verwendung von Vollblut lagen im allgemeinen um eine log 2-Stufe niedriger als diejenigen des entsprechenden Serums.

MOENNIG und Mitarb. (1981) bestätigten die Ergebnisse von FORSCHNER und Mitarb. (1981). In ihren Untersuchungen betrug die Übereinstimmung der Ergebnisse von ELISA und SNT 97,2 %. 2 von 471 getesteten Schweineseren waren nur im SNT und 7 nur im ELISA positiv, wobei die Antikörper gegen das AV mit einer Ausnahme lediglich in der niedrigsten Serumverdünnungsstufe nachweisbar waren. Die ELISA-Titer waren regelmäßig höher als die entsprechenden SNT-Titer. In den Seren von 7 mit dem AV infizierten Ferkeln traten positive Reaktionen 4 bis 7 Tage früher auf als im SNT.

2.2.5. FAMILIE POXVIRIDAE

GENUS ORTHOPOXVIRUS

Die Antikörperantwort von Affen auf eine Infektion mit dem

Affenpockenvirus verfolgten WENNER und Mitarb. (1968) mittels der HAH und des SNT. In der HAH waren Antikörper zu einem früheren Zeitpunkt nachweisbar und erreichten den höchsten Antikörpertiter vor dem SNT. Während die neutralisierenden Antikörper bis zum 4. Monat p.i. ständig anstiegen, war der HAH-Titer bereits 3 Wochen p.i. am höchsten und fiel danach wieder ab. Die von der Infektion genesenen Affen waren gegen Vacciniavirus immun. HAH-positive Seren reagierten mit Vacciniavirus genauso hoch wie mit Affenpockenvirus.

GISPEN, BRAND-SAATHOF und HEKKER (1976) wiesen Antikörper gegen das Affenpockenvirus in den Seren experimentell bzw. natürlich infizierter Affen mittels des IFAT und des SNT nach. Eine Kreuzreaktion der Seren mit Vacciniavirus im IFAT konnte durch vorherige Absorption der Seren mit Vacciniavirus-Antigen beseitigt werden. Die Autoren demonstrierten spezifische fluoreszierende Antikörper gegen das Affenpockenvirus in 3 Seren von Menschen und in 4 von 13 untersuchten Seren wildlebender Affen.

ESPOSITO, OBIJESKI und NAKANO (1977) untersuchten die serologische Verwandtschaft von Affenpocken-, Variola- und Vaccinia-Virus. Durch die Kreuzreaktivität der Antiseren in der KBR war keine Unterscheidung möglich. Dagegen gelang es durch Absorption der Antiseren mit heterologem Antigen, Kreuzreaktionen in der AGP zu beseitigen. Die absorbierten Seren bildeten Immunpräzipitate mit so spezifischem Charakter, daß eine Virusklassifizierung mit diesem Test möglich war. Bei der Untersuchung von Seren pockengeimpfter Menschen und Vacciniahyperimmunseren von Kaninchen fanden MARENNIKOVA, MALCEVA und HABAHASEVA (1981) eine hohe Sensibilität des ELISA. Die Antikörpertiter dieses Tests waren höher als diejenigen anderer serologischer Verfahren (SNT, HAH, IHA, AGP, IFAT). Mit dem ELISA ließen sich aufgrund der Titerhöhe nahe verwandte Pockenviren (Vacciniavirus, Whitepoxvirus, Affenpockenvirus) unterscheiden. Die hier in niedrigeren Stufen vorhandenen Kreuzreaktionen konnten durch Absorption der Hyperimmunseren mit dem jeweiligen heterologen Antigen beseitigt werden.

CHRISTENSEN, WEISBROTH und MATANIC (1966) führten den IFAT zum Nachweis von Antikörpern gegen das Ektromelie-Virus in Mäuseseren ein. Dieses Verfahren erwies sich als weitaus sensibler als die HAH. Besonders bei

latentem Ektromelievirus-Infektionen waren mit der HAH bei gleichzeitig positiven IFAT-Ergebnissen keine Antikörper nachweisbar.

Die Brauchbarkeit der AGP, HAH, des IFAT und des PRT zur Überwachung von Mäusezuchtbeständen auf das Freisein von der Infektion mit dem Ektromelievirus prüften ROHDE und KARASEK (1970). Die Autoren bezeichneten die HAH als Methode der Wahl, da dieses Verfahren rationell, leicht ablesbar und ausreichend sicher war. Im Gegensatz zu CHRISTENSEN, WEISBROTH und MATANIC (1966) wurde der IFAT als nicht brauchbar bezeichnet, da eine unspezifische Fluoreszenz nicht zu vermindern war. Der PRT erzielte zwar zum Teil um eine Stufe höhere Titer als die HAH, war jedoch viel schwieriger durchführbar und arbeitsaufwendiger. Die Eignung der AGP wurde durch eine geringere Sensibilität eingeschränkt.

COLLINS, PETERS und PARKER (1981) beschrieben den ELISA als sensibles und schnelles Nachweisverfahren für Ektromelievirus-Antikörper. Als Antigen für diesen Test benutzten die Autoren Vacciniavirus. In den untersuchten Mäuseseren wurden mit dem ELISA bis zu 50fach höhere Titer erzielt als mit der HAH. Im Vergleich zum IFAT stellte sich jedoch eine geringere Spezifität des ELISA heraus. Dennoch empfahlen die Autoren den IFAT nur zur Absicherung positiver Ergebnisse der HAH und des ELISA, da dieses Verfahren wegen seiner Aufwendigkeit für Screening-Tests nicht brauchbar sei. Auch die KBR eignet sich nicht für größere Reihenuntersuchungen, weil viele Mäuseseren antikomplementäre Eigenschaften aufweisen und daher nicht geprüft werden können.

GENUS AVIPOXVIRUS

UPPAL und NILAKANTAN (1970) prüften mittels des SNT, der KBR und der AGP die serologische Verwandtschaft zwischen verschiedenen bei Vögeln vorkommenden Pockenviren, dem Schaf- und dem Ziegenpockenvirus sowie dem Vacciniavirus. Mit allen 3 Verfahren waren Kreuzreaktionen nur einerseits zwischen den Vogelpockenviren und andererseits zwischen dem Schaf- und dem Ziegenpockenvirus zu beobachten. Die Titer im SNT und in der KBR waren zwischen dem homologen Antikörper und Antigen jeweils höher als mit heterologem Antigen. In der AGP konnte die Unterscheidung zwischen homologem und heterologem Antigen zum Teil durch eine unterschiedliche Anzahl von Präzipitationslinien getroffen werden.

Die IHA und den SNT zogen TRIPATHY, HANSON und KILLINGER (1973) zur Differenzierung verschiedener Vogelpockenviren heran. Kreuzreaktionen traten in der IHA in jedem Antigen-Antikörper-System auf, während mit dem SNT eine Unterscheidung der Antigene weitgehend möglich war. Lediglich in Antiseren gegen Hühnerpocken- und Kanarienvogelpockenvirus zeigte sich eine Kreuzneutralisation bis zur Verdünnungsstufe 1:20.

GENUS CAPRIOPOXVIRUS

DAVIES und OTEMA (1978) benutzten den SNT und den IFAT zum Antikörpernachweis gegen ein Pockenvirus von Schafen und Ziegen in Kenya. Neun Schafe wurden mit diesem virulenten Virus infiziert. Sowohl im SNT als auch im IFAT traten die höchsten Antikörpertiter einen Monat p.i. auf. Nach einem Abfall des Antikörperspiegels über 6 bis 8 Monate blieben die Titer bis zum 18. Monat p.i. relativ konstant. Mit diesen Verfahren waren auch 24 Monate p.i. noch Antikörper feststellbar. Beide Tests erwiesen sich somit als relativ einfach durchführbar und brauchbar für den Antikörpernachweis gegen dieses Virus.

SELBSTÄNDIGE SPEZIES DER SUBFAMILIE CHORDOPOXVIRIDAE

WOLFE, ADLER und GRIESEMER (1968) untersuchten die Antikörperbildung in Seren von Affen, die über ein Aerosol oder subkutan mit Yaba-Virus infiziert worden waren, mit der KBR und dem SNT. Bei Verwendung von aus Tumoren gewonnenem Antigen erzielte die KBR höhere Titer als mit Zellkulturantigenen. Der Zeitpunkt des Auftretens der Antikörper und die höchsten Titer waren in der KBR und im SNT ähnlich, wobei Tumoren immer nur vor dem Erscheinen der Antikörper nachweisbar waren.

2.3. VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN BEI INFESTIONEN MIT RNS-HALTIGEN VIREN

2.3.1. FAMILIE PICORNAVIRIDAE

GENUS ENTEROVIRUS

Anlässlich eines Ausbruchs von Vesikulärkrankheit der Schweine in

Großbritannien 1972 bis 1973 untersuchten GOLDING und Mitarb. (1976) 1759 in Schlachthöfen gesammelte Schweineseren auf spezifische Antikörper. Es kamen die RID und der SNT zur Anwendung. Die Empfindlichkeit der RID konnte durch Verwendung radioaktiv markierten Antigens und die Sichtbarmachung des Ergebnisses durch Strahlungsphotographie gesteigert werden. Die ersten 500 Seren wurden mit beiden Verfahren vergleichend getestet. Von 83 Seren mit präzipitierenden Antikörpern wiesen lediglich 42 neutralisierende Antikörper in Verdünnungsstufen von 1:8 bis 1:22 auf. Andererseits waren 38 Seren mit ähnlich hohen SNT-Titern in der RID negativ. Danach wurden nur noch die RID-positiven Seren im SNT zur Feststellung des Neutralisationstiters untersucht. Von 187 RID-positiven Seren wiesen 44 einen SNT-Titer von $<1:32$ auf, was als zweifelhaftes Ergebnis angesehen wurde. Nur 14 Seren von Schweinen aus 7 Beständen hatten letztlich einen signifikanten SNT-Titer von 1:45 bis 1:1400. Klinische Anzeichen der Vesikulärkrankheit waren lediglich in einem dieser 7 Bestände vorhanden. Die Autoren empfahlen, den RID aufgrund seiner offenbar größeren Sensibilität und des geringeren Arbeitsaufwandes als Screening-Test zum Antikörpernachweis gegen das Virus der Vesikulärkrankheit einzusetzen und die SNT-Titer der RID-positiven Seren zu bestimmen.

PEREIRA, ROWE und BABER (1976) verglichen den Doppelimmunodiffusionstest (DID) mit dem SNT. Sie fanden bei der Untersuchung von 711 Schweineseren eine hochgradige Übereinstimmung. Da SNT-Titer bis 1:16 als unspezifische Reaktion auftraten, wurden nur Titer $\geq 1:32$ als signifikant angesehen. Unter dieser Voraussetzung ergab der DID-Test nur ein falsch positives Ergebnis unter 479 SNT-negativen Seren und 30 falsch negative Ergebnisse unter 232 SNT-positiven Seren, die Titer von 1:32 bis $\geq 1:128$ aufwiesen. Zweifelhafte DID-Resultate wurden in 33 Fällen beobachtet. Der DID-Test war somit zwar weniger sensibel als der SNT, war aber einfacher durchführbar, billiger und ermöglichte eine schnellere Ablesung der Ergebnisse als der SNT.

GENUS APHTOVIRUS

LODETTI, DE SIMONE und NARDELLI (1972) führten den Antigennachweis des Maul- und Klauenseuche-Virus (MKSv) und der entsprechenden Antikörper

mittels des Mikrokultur-PRT. Dieser Test war beim Antikörpernachweis in Seren vakzinierter oder infizierter Rinder empfindlicher als die KBR. Trotz einer gegenüber dem SNT auf Babymäusen geringeren Sensibilität sprachen die Autoren dem Mikrokultur-PRT aufgrund der Arbeits- und Zeitersparnis die Eignung zur Massenuntersuchung auf MKSV-neutralisierende Antikörper zu.

RAI und LAHIRI (1981) entwickelten einen ELISA zum Nachweis von MKSV und dessen Antikörpern. Als Antigen verwendeten sie das MKSV Typ 0, Subtyp O₅. Beim Antikörpernachweis erwies sich der ELISA als sensibler als die KBR. Hyperimmunseren von Meerschweinchen erzielten im ELISA Titer bis 1:2896 und in der KBR bis 1:128.

2.3.2. FAMILIE REOVIRIDAE

GENUS ORBIVIRUS

PINI und Mitarb. (1968) verfolgten die Antikörperantwort von mit Bluetongue-Virus (BTV) infizierten Schafen mittels des IFAT und des SNT. Mit beiden Methoden wurden die höchsten Titer 4 Wochen p.i. festgestellt, wobei die IFAT-Titer stets wesentlich höher waren. Der IFAT reagierte darüberhinaus bereits zwischen dem 7. und 11. Tag p.i. positiv, während neutralisierende Antikörper erst ab dem 16. Tag p.i. demonstrierbar waren. Fluoreszierende Antikörper persistierten über den gesamten Beobachtungszeitraum von 66 Wochen p.i.. Der SNT reagierte dagegen teilweise ab der 44. Woche p.i. negativ. Ferner traten im IFAT weniger individuelle Schwankungen des Antikörperverlaufes auf. Die IFAT-Titer waren nicht signifikant verschieden, wenn anstelle des homologen ein anderer BTV-Serotyp verwendet wurde. Wegen dieser Gruppenspezifität war der IFAT im Gegensatz zum SNT als typspezifische Methode nicht zur Typisierung von BTV-Isolaten geeignet. Der IFAT war jedoch weniger laboraufwendig als der SNT und für serologische Reihenuntersuchungen gut brauchbar.

BLUE, DAWE und GRATZEK (1974) führten die IHA zum Nachweis von Antikörpern gegen das BTV ein. Diese traten bereits am 3. Tag p.i. auf

und stiegen bis zum 7. Tag p.i. an, um anschließend bis zum 42. Tag p.i. konstant zu bleiben. Eine Boosterinfektion bewirkte einen starken Antikörperanstieg. Die vergleichend durchgeführte AGP ergab nur bei einem von zwei infizierten Schafen und zudem erst am 49. Tag p.i. ein positives Ergebnis. Die Autoren betrachteten nur IHA-Titer $\geq 1:40$ als spezifisch, wobei sie die Spezifität des Tests durch eine passive Hämagglutinationshemmung nachwiesen: bei einstündiger Inkubationszeit der Seren mit BTV vor Zugabe der BTV-sensibilisierten Erythrozyten erfolgte ein mindestens achtfacher Abfall des Titers. Große Bedeutung maßen die Autoren der IHA zu, da mit dieser Methode bereits am 3. Tag p.i. Antikörper nachweisbar waren; damit würde eine für die Bekämpfung der Erkrankung wichtige frühzeitige Erkennung infizierter Tiere möglich sein.

BOULANGER und FRANK (1975) beschrieben eine modifizierte KBR zum Nachweis von Antikörpern gegen das BTV. Die hauptsächliche Modifikation des Testes lag darin, daß dem Meerschweinchenkomplement 5 % aktives normales Kälberserum zugesetzt wurde. Bei der Untersuchung von 19 Seren, die von Hirschen aus den USA stammten, waren spezifische Antikörper mit der KBR in 10 Seren nachweisbar, von denen 9 in der AGP bestätigt wurden. Beide Testverfahren waren gruppenspezifisch und reagierten mit allen verwendeten BTV-Stämmen. Auch mit dem FAT auf Zellkulturen war es nicht möglich, verschiedene Virusstämme zu unterscheiden. Ebenfalls traten im PRT Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen BTV-Isolaten auf. Obwohl oft quantitative Unterschiede der Reaktionen zu erkennen waren, konnte mit dem PRT keine Klassifikation der Virusisolate erfolgen.

Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse des PRT mit der KBR und der AGP fanden THOMAS und Mitarb. (1976). Sie untersuchten insgesamt 137 Serumproben auf Antikörper gegen das BTV. 105 Serumproben wurden von 17 Rindern und 6 Schafen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit BTV entnommen und 32 Seren stammten von krankheitsverdächtigen Rindern und Hirschen. Der SNT erwies sich als sensibler als die beiden anderen Methoden. Alle positiven Reaktionen in der KBR und der AGP konnten durch den SNT bestätigt werden, während neutralisierende Antikörper häufig bei negativem Ausgang der anderen Verfahren nachweisbar waren. Dies war meist erklärbar durch das spätere Auftreten komplementbindender bzw. präzipitierender Antikörper.

Positive SNT-Ergebnisse traten zwischen der 1. und 2. Woche p.i. auf und erzielten die höchsten Titer von $\geq 1:10000$ in der 2. bis 3. Woche p.i., während die KBR erst ab der 2. bis 3. Woche p.i. positiv reagierte und höchste Werte von $>1:160$ 4 bis 6 Wochen p.i. auftraten. Positive AGP-Ergebnisse waren etwa zur selben Zeit wie diejenigen der KBR zu beobachten. Die Reaktivität der drei Verfahren blieb in der Regel über den Beobachtungszeitraum, der mehrere Monate umfaßte, bestehen. Einen möglichen Vorteil der KBR und der AGP sahen die Autoren in der Gruppenspezifität dieser Methoden, da Neutralisationstiter mit anderen BTV-Serotypen sehr niedrig ausfallen könnten.

Die Einsatzmöglichkeit des ELISA zum Antikörpernachweis gegen das BTV prüften MANNING und CHEN (1980). Je ein Schaf wurde mit einem der 4 in der USA vorkommenden Serotypen des BTV infiziert. Spezifische Ig G-Antikörper waren erstmals am 6. Tag p.i. nachweisbar. Es erfolgte ein Anstieg des Antikörperspiegels über den gesamten Beobachtungszeitraum von 35 Tagen auf Titer von $1:1600$ bis $\geq 1:3200$. Jedes der 4 Immunseren kreuzreagierte gleichermaßen mit Antigenpräparationen der anderen 3 Serotypen, sodaß jeder Serotyp des BTV für die Antigenpräparation zum ELISA geeignet war. Im Vergleich mit anderen Antikörpernachweismethoden wies der ELISA einige Vorteile auf: So benötigte die Durchführung des ELISA nur einige Stunden, während die Ergebnisse des SNT und der AGP erst nach mehreren Tagen verfügbar waren. Im Gegensatz zur KBR spielten im ELISA antikomplementäre Serumfaktoren keine Rolle. Gegenüber der nur mit unverdünnten Seren durchgeführten AGP und der im allgemeinen relativ niedrige Titer erzielenden KBR ragte die Sensibilität des ELISA heraus. Die Autoren beurteilten ihn insgesamt als sehr brauchbaren Test zur Serodiagnose der Bluetongue.

In Übereinstimmung mit MANNING und CHEN (1980) bezeichneten POLI und Mitarb. (1982) den ELISA als gegenüber SNT und AGP vorteilhaftere Methode. Beim Nachweis von BTV-Antikörpern in Rinderseren war zwischen den Ergebnissen des ELISA und des SNT eine vollkommene Korrelation festzustellen, wobei der ELISA jedoch einfacher und schneller durchführbar war. Dagegen fanden die Autoren eine erhebliche Anzahl von Seren, die bei ELISA-positiver Beurteilung in der AGP negativ reagierten. Deshalb muß der ELISA als die empfindlichere Methode angesehen werden.

Den Antikörpernachweis gegen das Virus der Afrikanischen Pferdepest führten HAZRATI, MIRCHAMSY und BAHRAMI (1972) mittels des SNT, der KBR und der AGP. Neutralisierende Antikörper waren ab dem 4. Tag p.i. nachweisbar. Der Antikörperspiegel erreichte zwischen dem 10. und 12. Tag p.i. sein Maximum und blieb über den Beobachtungszeitraum von 13 Wochen p.i. auf hohem Niveau bestehen. Komplementbindende und präzipitierende Antikörper traten einige Tage später auf und erzielten die höchsten Titer später, fielen allerdings auch schneller wieder ab als die neutralisierenden Antikörper. In Seren von Pferden, die mit attenuiertem Virus infiziert worden waren, reagierte nur der SNT stets positiv. Die KBR und die AGP zeigten lediglich niedrige Titer und ermöglichten den Antikörpernachweis nur über einen kurzen Zeitraum. Die Stimulation der Bildung komplementbindender und präzipitierender Antikörper nahm mit dem Grad der Virulenzabschwächung der Virusstämme ab. Neutralisierende Antikörper wurden dagegen immer in hohem Maße gebildet. Während eine Zweitinfektion einen schnellen Anstieg des SNT-Titers bewirkte, konnte in der KBR und AGP kein signifikanter Titeranstieg beobachtet werden. Der SNT war somit zur Bestimmung des Immunstatus von Pferden gegen die Afrikanische Pferdepest die geeignetste Methode.

GENUS ROTAVIRUS

Antikörper gegen Rotaviren wiesen ELLENS, DE LEEUW und STRAVER (1978) mittels des ELISA im Kolostrum von Rindern nach. In insgesamt 216 Kolostrumproben fanden die Autoren Titer von unter 1:100 bis 1:6400. Beim Vergleich in 35 Kolostrumproben mit einem Immunofluoreszenzneutralisationstest wurde eine enge Obereinstimmung der Ergebnisse festgestellt. Dieser Test erwies sich jedoch als zu arbeits- und zeitaufwendig. Die Antikörpertiter des Kolostrums fielen, wie beide Testverfahren zeigten, innerhalb von 24 Stunden nach dem Kalben auf etwa ein Viertel des ursprünglichen Wertes ab.

STUKER und Mitarb. (1979) untersuchten 128 Affenseren mittels des ELISA, des SNT und der KBR auf Antikörper gegen Rotaviren. Die beste Korrelation der Ergebnisse ergab sich mit einer 88%igen Obereinstimmung zwischen dem ELISA und dem SNT. Die lediglich 74%ige Obereinstimmung zwischen dem ELISA und der KBR war auf die geringe Sensibilität der KBR zurückzuführen. Kein positives SNT- oder KBR-Ergebnis wurde im ELISA negativ beurteilt. Die Titer des ELISA waren 8 bis 64fach höher

als die entsprechenden KBR-Titer bzw. 2 bis 16fach höher als diejenigen des SNT.

Die Ergebnisse des SNT gaben zu der Vermutung Anlaß, daß verschiedene Rotavirusstämme an den Infektionen der untersuchten Affen beteiligt waren. Aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit und großen Sensibilität schlugen die Autoren den ELISA als Routinemethode zum Antikörpernachweis gegen Rotaviren vor.

2.3.3. FAMILIE TOGAVIRIDAE

GENUS PESTIVIRUS

GUTEKUNST und MALMQUIST (1964) prüften mittels KBR und SNT die Verwandtschaft zwischen dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) und dem Virus der Europäischen Schweinepest (ESPV). In 5 ESPV-Antiseren waren komplementbindende Antikörper bei Verwendung von löslichem BVDV-Antigen mit Titern von 1:80 bis 1:640 nachweisbar. Dagegen enthielten die Antiseren bis auf eine Ausnahme keine BVDV-neutralisierenden Antikörper. Kreuzneutralisationsteste mit den Seren zweier Kälber, von denen je eines mit einem zytopathogenen bzw. nicht zytopathogenen BVDV-Stamm infiziert wurde, zeigten die Typspezifität des SNT, während beide Seren gegen die Antigene ähnlich hohe KBR-Titer entwickelten. Nach einer Infektion mit BVDV sind komplementbindende Antikörper bei Verwendung eines homologen Antigens vor den neutralisierenden Antikörpern nachweisbar. Sie bleiben wochenlang auf einem hohen Niveau bestehen. Mit beiden Methoden war der höchste Antikörperspiegel etwa 6 Wochen p.i. zu beobachten. Eine Zweitinfektion mit BVDV führte zu einem schnellen Anstieg des SNT-Titers, während sie auf die komplementbindenden Antikörper keinen sichtbaren Effekt hatte.

RUCKERBAUER und Mitarb. (1971) fanden, daß nach einer Infektion spezifische Antikörper gegen BVDV mit dem SNT 7 bis 10 Tage früher nachweisbar sind als mit der KBR. Der SNT zeigte auch höhere Titer an als die KBR. Die SNT-Titer blieben bis zur 70. Woche p.i. auf hohem Niveau bestehen, ob eine Boosterinfektion vorgenommen worden war oder nicht. Dagegen war ein signifikanter KBR-Titer nicht über 20 Wochen p.i. hinaus nachweisbar. Eine Boosterinfektion verlängerte diesen Zeitraum

lediglich auf 32 Wochen p.i.. Die Autoren hielten daher die KBR zur Diagnose frischer BVDV-Infektionen geeignet, während der SNT sowohl frische als auch bereits längere Zeit bestehende Infektionen nachweisen könnte. Die Seren experimentell infizierter Kälber wiesen im SNT Titer bis 1:6400 und in der KBR bis 1:160 auf. Die höchsten Antikörpertiter zweier natürlich infizierter Kälber betrugen 1:3200 im SNT und 1:320 bzw. 1:80 in der KBR. Die Untersuchungen ergaben ferner, daß Immunsereen mit KBR-Titern von 1:40 bis 1:320 bzw. SNT-Titern von 1:1600 bis 1:3200 zur Gewinnung von Konjugaten für den FAT geeignet sind, wobei einem hohen KBR-Titer eine besonders wichtige Bedeutung zukam.

Zum Nachweis der Antikörper gegen das BVDV war auch eine kombinierte SNT-FAT-Methode gut anwendbar. Fetale Rindernieren-Zellkulturen wurden 24 bis 48 Stunden nach Inokulation mit einem Virus-Serum-Gemisch mittels fluoresceinkonjugierter spezifischer Antikörper gefärbt. Das nicht neutralisierte Virus wurde durch auftretende Fluoreszenz nachgewiesen. Die auf diese Weise erhaltenen Serumantikörpertiter standen in völliger Obereinstimmung mit denjenigen des Standard-SNT, der auf der Beobachtung eines cpE beruhte. Beim Antigennachweis hatte die FAT gegenüber dem SNT den Vorteil, nur 3 bis 4 Tage anstelle von 2 bis 3 Wochen zur Durchführung zu benötigen. Außerdem konnten mit dem FAT sowohl zytopathogene Virusstämme als auch solche, die keinen derartigen Effekt bewirkten, entdeckt werden. Es erwies sich jedoch als notwendig, die Zellkulturen auf latente BVDV-Infektionen zu überprüfen.

RESSANG und VAN BEKKUM (1972) erprobten den IFAT zum Nachweis von gegen das Virus der Europäischen Schweinepest (ESPV) gerichteten Antikörpern in 103 Schweineseren. Die Ergebnisse wurden mit einem Plaquereduktionstest mittels Fluoreszenzantikörpertechnik (PRT), dem SNT und einem Plaquetest unter Agarose (Plaque Counting Technique, PCT) verglichen. In 7 von 27 Seren rekonvaleszenter Schweine konnten mit dem IFAT bei positiven Resultaten der anderen Tests keine Antikörper nachgewiesen werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Untersuchung von Schweinen aus Beständen, in denen die klinische Diagnose der Erkrankung durch Virusisolation oder positive Gefrierschnitte bestätigt wurde. Hier waren 5 Seren im IFAT negativ, die in den anderen Tests positiv beurteilt wurden. 2 dieser Seren fielen auch im SNT negativ aus. In Hyperimmunsereen von Schweinen wurden mit allen Verfahren spezifische

Antikörper gefunden. Die Titer des IFAT, SNT und PCT waren miteinander vergleichbar, während der PRT etwas höhere Titer erzielte. Neben dieser größeren Sensibilität erlaubte der PRT den Antikörpernachweis bereits am 7. p.i.. Der PCT wurde als zu aufwendig für umfangreichere Untersuchungen angesehen. Die negativen IFAT-Ergebnisse bei positiven Resultaten der anderen Verfahren führten die Autoren auf einen zu niedrigen Antikörpertiter oder auf das Vorherrschen von Ig M-Antikörpern in einem frühen Stadium der Infektion zurück, die wegen der Verwendung eines Ig G-Konjugates im IFAT nicht erfasst werden konnten. Der Vorteil des IFAT lag in seiner einfachen und schnellen Durchführbarkeit, weshalb die Autoren den IFAT besonders für Screening-Tests empfahlen.

SAUNDERS und WILDER (1974) entwickelten einen Enzyme-labeled Antibody Test (ELA) zum Nachweis von Antikörpern gegen das ESPV. Die Autoren untersuchten 164 Schweineseren in einer Verdünnung von 1:6. In 40 Seren waren Antikörper nachweisbar, während 124 Seren negativ beurteilt wurden. Die ELA-positiven Ergebnisse wurden bis auf eine Ausnahme durch den SNT mit Titern von 1:4 bis 1:4096 bestätigt. Dieses eine offensichtlich falsch positive Ergebnis des ELA schränkte nach Ansicht der Autoren die Verwendbarkeit dieser Methode für Screening-Tests nicht ein, solange positive Ergebnisse einer weiteren Untersuchung unterzogen würden. Sensibilitätsprüfungen ergaben, daß die ELA-Titer um eine Größenordnung über denjenigen des SNT lagen. Der ELA stellte demnach eine schnelle, einfache und wenig aufwendige Methode zum Antikörpernachweis dar.

ESKILDSSEN und OVERBY (1976) prüften die Verwendbarkeit der KBR und des Plaquereduktionstestes mittels Immunofluoreszenz (PRT) zur Diagnose subklinischer Infektionen des Schweines mit ESPV. Nach ihren Angaben traten komplementbindende Antikörper früher auf als neutralisierende. Sie erreichten 2 Wochen p.i. ihr Maximum, während der höchste Neutralisationstiter gegen das ESPV 4 bis 6 Wochen p.i. erzielt wurde. Bei Verwendung von BVDV-Antigen im PRT waren neutralisierende Antikörper noch später und mit niedrigeren Titern nachweisbar. Das Verhalten in der KBR hing allerdings vom verwendeten ESPV-Antigen ab. Die Autoren beurteilten die KBR als genauso sensibel wie den PRT, jedoch als weniger arbeits- und zeitaufwendig. Sie empfahlen die KBR deshalb als brauchbare Methode zum Antikörpernachweis gegen das ESPV und das BVDV.

Die Antikörperantwort von Ferkeln auf eine Impfung mit ESPV (C-Stamm) untersuchten TERPSTRA und TIELEN (1976). Der Antikörpernachweis erfolgte vergleichend mit dem PRT und dem IFAT. Alle Seren von 37 geimpften Ferkeln wurden mit beiden Methoden positiv beurteilt. Die Titer lagen zwischen 1:24 und 1:6400 im PRT bzw. 1:10 und 1:4096 im IFAT. In einem weiteren Versuch wurde die Impfung dann als erfolgreich angesehen, wenn ein Serum einen Titer von $>1:20$ im PRT bzw. $\geq 1:10$ im IFAT aufwies. Es war ein deutlicher Anstieg des Impferfolges mit dem Impfalter zu verzeichnen, und zwar von 47 auf 80% im PRT und von 67 auf 90% im IFAT. In der Vergleichsgruppe, die aus vakzinieren Ferkeln nichtgeimpfter Sauen bestand, erreichte der Anteil immuner Tiere durchschnittlich 93 % im PRT und 100% im IFAT. Mehrmals gelang ein Antikörpernachweis bei Tieren aus nichtgeimpften Kontrollgruppen. Dies werteten die Autoren als Beweis für eine Verbreitung des Impfvirus. Im Vergleich beider Methoden war in Übereinstimmung mit RESSANG und VAN BEKKUM (1972) der IFAT schneller und einfacher durchführbar als der PRT. Die Nachteile des IFAT lagen darin, daß die Titer nicht scharf ablesbar waren, Antikörper der Ig M-Klasse nicht gemessen wurden und wenig oder keine Unterscheidung zu Antikörpern gegen das BVDV getroffen werden konnte. Entsprechend wurde der PRT als spezifischer angesehen. Auch wurde den neutralisierenden Antikörpern mehr Bedeutung hinsichtlich des Infektionsschutzes beigemessen als denjenigen, die im IFAT gemessen wurden.

SAUNDERS (1977) bestätigte anhand einer größeren Anzahl an untersuchten Seren die gute Übereinstimmung der Ergebnisse des ELA und des SNT, die SAUNDERS und WILDER (1974) beschrieben hatten. Für 640 auf Antikörper gegen das ESPV untersuchte Seren fand der Autor eine 99%ige Korrelation der Ergebnisse. In beiden Tests wurden jeweils ein falsch positiver und mehrere falsch negative Befunde erhoben. Beiden Verfahren gemeinsam war auch das Problem der Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen das BVDV. So zeigten über 80% der Seren mit einem Titer im BVDV-SNT von $\geq 1:64$ sowohl im ELA als auch im ESPV-SNT positive Resultate. Eine Unterscheidung der Antikörper könnte nach Ansicht des Autors jedoch durch eine Endpunktanalyse möglich sein: für je ein Serum eines ESPV- bzw. BVDV-infizierten Schweines mit kreuzreagierenden Antikörpern wurde der Endtiter unter Verwendung von ESPV- und BVDV-infizierten Zellen als Antigen bestimmt. Beide Seren wiesen mit ihrem homologen Antigen einen höheren

Endtiter auf. Mit dem ELA konnten 22 Serumproben innerhalb einer Stunde getestet werden. Der ELA hatte außerdem den Vorteil, daß seine Reagentien transportierbar waren und damit die Durchführung des Testes in epizootischen Gebieten möglich war.

HUCK und Mitarb. (1975) untersuchten die Seren von Schafen, Ziegen und deren Lämmern auf Antikörper gegen das Border Disease Virus. Dieser Erreger, der Fetopathien hervorruft, soll mit dem BVDV eng verwandt oder identisch sein. Die Antikörper wurden mit der ID, KBR, dem SNT und dem Immunofluoreszenz-Neutralisationstest (FNT) nachgewiesen. Als Antigen wurde BVDV für den SNT, BVD-Antigene für die ID und KBR sowie ESPV für den FNT verwendet. Insgesamt wurde bei 343 von 452 Seren eine Übereinstimmung der Ergebnisse aller vier Methoden festgestellt. Davon wurden 215 Seren negativ und 128 positiv beurteilt. ID und KBR zeigten in 390 der 452 Seren Übereinstimmung, SNT und FNT in 430 Seren, ID und SNT in 393 sowie KBR und FNT in 367 Seren. Der Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das BVDV und ESPV sowie die enge Übereinstimmung der Ergebnisse von ID, KBR und der Neutralisationsteste ließen auf die nahe Verwandtschaft des Erregers der Border Disease mit diesen Viren schließen. Zusätzlich lag die Folgerung nahe, daß die vier Testmethoden ähnliche Antikörper messen.

2.3.4. FAMILIE ORTHOMYXOVIRIDAE GENUS INFLUENZAVIRUS

MOSER (1971) untersuchte 538 in Schlachthöfen Bayerns gesammelte Schweineseren auf Antikörper gegen Influenzavirus, Stamm Influenza A2/Hongkong/1/68. Da in der HAH mit unbehandelten Seren viele unspezifische Reaktionen auftraten, wurden die Seren zur Entfernung unspezifischer Seruminhibitoren mit Kaolin vorbehandelt. Dadurch verringerte sich der Anteil an Seren mit hämagglutinationshemmenden Antikörpern von 246 auf 18. 33 Seren wurden vergleichend im SNT auf spezifische Antikörper untersucht. In 11 von 21 nach Kaolinvorbehandlung HAH-negativen Seren und in 10 von 12 HAH-positiven Seren waren neutralisierende Antikörper nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigte, daß die Kaolinvorbehandlung der Seren teilweise auch spezifische Antikörper entfernte. Besonders bei niedrigen Antikörpertitern mußte somit mit der Vortäuschung falsch negativer Reaktionen gerechnet werden.

Die Antikörperantwort von Pferden auf eine zweimalige Impfung mit 4 verschiedenen polyvalenten Influenzavakzinen prüften BÖRKI und SIBALIN (1972) mittels der HAH und der KBR. 14 der 28 Pferde zeigten bereits vor der Impfung hämagglutinationshemmende und 3 komplementbindende Antikörper. Die Impfstoffe wiesen alle eine vergleichbare Immunogenität auf. Nach der Immunisierung trat ein signifikanter, mindestens 4facher Titeranstieg in der HAH ein, und 24 der 28 Pferdeseren reagierten nach 3 Wochen in der KBR positiv. Die postvakzinalen HAH-Titer wurden von den vor der Impfung in niedrigen Titern vorhandenen Antikörpern günstig, jedoch von bereits in hohen Titern vorhandenen Antikörpern ungünstig beeinflusst. Bereits 6 Monate nach der Zweitimpfung waren die hämagglutinationshemmenden Antikörper zum Teil unter die Nachweisgrenze abgefallen, sodaß die übliche Nachimpfung in einjährigem Abstand von den Autoren für einen konstanten Infektionsschutz als nicht ausreichend angesehen wurde.

2.3.5. FAMILIE PARAMYXO VIRIDAE

GENUS MORBILLIVIRUS

NOON und Mitarb. (1980) zeigten, daß der ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Staupevirus genauso geeignet ist wie der SNT. Bei der Untersuchung von 273 Hundeseren in der Verdünnungsstufe 1:100 wurden übereinstimmend 112 Seren positiv und 153 Seren negativ beurteilt. In 5 Seren waren Antikörper nur mit dem SNT und in 3 Seren nur mit dem ELISA demonstrierbar. Dies entsprach einer Übereinstimmung der Ergebnisse von 97,1%. Auch die Titerhöhen beider Tests korrelierten gut miteinander, sodaß einem ELISA-Titer von $\geq 1:100$ ein Infektionsschutz gegen das Staupevirus zugemessen wurde. Um den Antikörperverlauf in den Seren zweier experimentell infizierter Hunde verfolgen zu können, verwendeten die Autoren ein IgM erfassendes Konjugat im ELISA. Dieser Test reagierte bereits 7 Tage p.i. und somit eine Woche vor dem SNT positiv, während IgG-Antikörper mit dem ELISA erst 4 bzw. 5 Wochen p.i. nachweisbar waren.

ROSSITER, JESSETT und HOLMES (1981) entwickelten einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Rinderpestvirus (RV). Zu diesem Zweck wurden Rinder mit einer RV-Vakzine immunisiert und ihre Seren 3 Wochen vor und nach Impfung gewonnen und geprüft. Die Ergebnisse des ELISA wurden mit

denjenigen des SNT verglichen. Im Gegensatz zum SNT, der arbeitsaufwendig war und 7 bis 8 Tage zu seiner Durchführung benötigte, stellte sich der ELISA als einfache, schnelle und zur Testung großer Anzahlen von Seren geeignete Methode heraus. Der ELISA konnte jedoch wegen seiner relativ geringen Sensibilität und Spezifität nicht als Alternativmethode zum SNT empfohlen werden. Einerseits waren die im ELISA und SNT erzielten Titer ähnlich hoch, andererseits erbrachte der ELISA aber bei insgesamt 152 Tests 12 falsch positive und 15 falsch negative Ergebnisse. Als Hauptursache hierfür sahen die Autoren die hohe Hintergrundreaktion an, die in allen Versuchen beobachtet wurde. Diese wurde auf Spuren von Rinderglobulin zurückgeführt, die vom Rinderserumzusatz zum Zellkulturmedium stammten. Mittels der KBR wurde eine Rinderglobulinaktivität bis 1:128 in infizierten und nicht infizierten Rindernierenzellantigenen demonstriert. Deshalb hielten die Autoren es für möglich, daß die Gewinnung von RV-Antigen in heterologen Systemen ohne Kontamination mit Rinderglobulin für den ELISA geeigneter wäre.

GENUS PNEUMOVIRUS

DESCOTEAUX und PAYMENT (1981) untersuchten 247 Seren von im Labor gehaltenen Ratten mit dem ELISA auf Antikörper gegen das Mäusepneumonievirus und verglichen die Ergebnisse mit denjenigen des SNT und der HAH. Der ELISA wurde von den Autoren als spezifischer und sensibler angesehen als die beiden anderen Verfahren, da mit diesem Test 25 % mehr Reagenten als mit der HAH und 23 % mehr als mit dem SNT nachgewiesen werden konnten. Positive HAH-Ergebnisse bei negativem Ausgang des ELISA traten nur in niedrigen Titerstufen bis 1:20 auf und wurden als unspezifisch beurteilt.

2.3.6. FAMILIE RHABDOVIRIDAE

GENUS LYSSAVIRUS

ATANASIU und PERRIN (1979) benutzen einen Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von Antikörpern gegen das Tollwutvirus in verschiedenen Säugtierseren. Die optische Dichte war bei Verwendung des Glykoproteins des Tollwutvirus als Antigen geringer als beim gesamten Viruspartikel, so daß auch unspezifische Reaktionen niedriger ausfielen. Die Seren ergaben nach einer Impfung immer höhere optische Dichten als vorher.

Die Ergebnisse des EIA standen in guter Übereinstimmung mit der Standardmethode zum Antikörpernachweis gegen das Tollwutvirus, dem SNT in der Maus. Die Seren mit den höchsten Neutralisationstitern bewirkten auch die größten optischen Dichten im EIA.

GUILLEMIN und Mitarb. (1981a) verglichen den SNT in der Maus mit einer anderen Methode zur Messung neutralisierender Antikörper, dem Fluoreszenzhemmungstest. Die Ergebnisse dieser beiden Tests mit insgesamt 89 Seren verschiedener Spezies, die zum Teil gegen Tollwut vakziniert worden waren, ähnelten sich, wobei sich der Fluoreszenzhemmungstest als das genauere Verfahren herausstellte. Außerdem war dieser Test billiger, erforderte keine Versuchstiere und ermöglichte die Beurteilung in weniger als 48 Stunden. Der SNT benötigte dagegen mindestens 2 Wochen.

In einer weiteren Untersuchung adaptierten GUILLEMIN und Mitarb. (1981b) den Fluoreszenzhemmungstest vom "Lab Tek" System auf das Mikroplaque-System. Die Prüfung von 33 Seren ergab eine so hochsignifikante Korrelation, daß zwischen den Ergebnissen, die in den beiden Testsystemen erhalten wurden, keine Unterschiede feststellbar waren. Bei einer Sicherheit von 95 % war eine Abweichung der Titer voneinander höchstens um den Faktor 2,2 zu beobachten.

2.3.7. FAMILIE CORONAVIRIDAE

GENUS CORONAVIRUS

OSTERHAUS, KROON und WIRAHADIREDDA (1979) entwickelten einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Peritonitis der Katzen (FIP) und verglichen die Ergebnisse mit denjenigen des IFAT. Für beide Verfahren wurde ein heterologes System verwendet, da als Antigen jeweils das Virus der Übertragbaren Gastroenteritis der Schweine diente. 40 Seren klinisch gesunder Katzen wurden mit Titern von $<1:20$ im IFAT bzw. $<1:40$ im ELISA negativ bewertet. In 25 Seren, davon in 14 Seren experimentell infizierter Katzen, waren Antikörper gegen das FIP-Virus mit Titern bis $>1:2560$ in beiden Methoden nachweisbar. Nur 8 Seren ergaben differierende Ergebnisse, wobei die Titer an den unteren Sensibilitätsgrenzen der Tests lagen: 7 Seren mit ELISA-Titern von $1:40$ bis $1:80$ waren fluoreszenzserologisch negativ und ein Serum mit einem

IFAT-Titer von 1:40 wurde im ELISA negativ beurteilt. Auch aufgrund der sehr gut mit dem IFAT korrelierenden Titer stellte der ELISA eine zuverlässige Nachweismethode für Antikörper gegen das FIP-Virus dar und war nach Ansicht der Autoren dazu geeignet, den IFAT in der Routine-serologie der FIP zu ersetzen.

STORZ und ROTT (1980) untersuchten die Seren von Rindern aus bestimmten Gebieten Hessens und Bayerns auf Antikörper gegen bovine Coronaviren. Von 321 Seren wiesen 188 in der ID präzipitierende Antikörper auf. Die Mehrzahl der Seren bildete nur eine, einige Seren auch bis zu drei Präzipitationslinien aus. Die Endpunkte einiger in der ID titrierter Seren lagen bei 1:8 bis 1:16. Zum Vergleich mit dem SNT wurden 66 Seren herangezogen. In allen 53 Seren, die präzipitierende Antikörper enthielten, waren auch neutralisierende Antikörper nachweisbar. Zusätzlich wurden 6 der 13 ID-negativen Seren im SNT positiv beurteilt. Der SNT war somit wesentlich empfindlicher als die ID. Keine Reaktionen traten in der ID mit einem Antiserum gegen das Coronavirus der Übertragbaren Gastroenteritis der Schweine auf noch mit Seren, die Antikörper gegen andere bei Rindern vorkommende Viren enthielten.

HORTIG, RÜDER und BROSKE (1980) prüften die Verwendbarkeit des Mikroneutralisationstestes (MNT), des IFAT und des Virusinhibitionstestes mittels Immunofluoreszenz (VIT) zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGE) des Schweines. Von 10 im MNT positiven Schweineseren mit Neutralisationstitern von 1:2 bis 1:32 wurden nur 3 im IFAT und 5 im VIT in Serumverdünnungsstufen von jeweils 1:2 bestätigt. Bei nochmaliger Prüfung dieser 10 Seren reagierten alle in den Verdünnungsstufen 1:5 und 1:10 sowohl im IFAT als auch im VIT negativ. Dies führten die Autoren zum Teil auf ein Absinken des Antikörpergehaltes unter die Nachweisgrenze zurück, zum Teil aber auch auf die geringere Sensibilität dieser beiden Tests. Bei beiden Verfahren wurde die Ablesung der Ergebnisse durch eine Hintergrundfluoreszenz erschwert. Im IFAT wurden 2 Seren und im VIT eines falsch positiv beurteilt. Die Autoren bezeichneten deshalb nur den MNT als ausreichend sichere Methode.

KODAMA, OGATA und SHIMIZU (1981) bestimmten den Ig A-Antikörpertiter gegen das TGE-Virus mittels der IP-Technik, um eine mögliche Beziehung

zwischen aktiver Immunität und dem Ig A-Titer festzustellen. Daneben wurde auch der Neutralisationstiter der Schweineseren bestimmt. Die Schweine waren natürlich oder auf verschiedene Weise experimentell infiziert worden. Während in der Gruppe natürlich infizierter Schweine in der akuten Krankheitsphase keine Antikörper nachweisbar waren, wurden in der Rekonvaleszenz (4 Wochen nach Beginn der Diarrhoe) ein Ig A-Titer bis 1:256 und ein SNT-Titer bis 1:64 gefunden. Bei Schweinen, die mit hochvirulentem TGE-Virus oral infiziert wurden, traten spezifische Antikörper ab dem 7. Tag p.i. auf; sie waren auch am 100. Tag p.i. mit beiden Methoden noch nachweisbar. Die Titer erreichten maximal 1:256 in der IP und 1:512 im SNT. In den Seren der Tiergruppe, die mit einem schwachvirulenten Virusstamm infiziert wurde, waren keine Ig A-Antikörper demonstrierbar. Der SNT-Titer lag dagegen ähnlich hoch wie in den anderen Gruppen.

Zur Feststellung der Immunitätslage wurden immunisierte Schweine einer Belastungsinfektion unterzogen. Tiere, die mit hochvirulentem Virus infiziert worden waren und zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion Ig A-Titer von 1:2 bis 1:512 bzw. SNT-Titer bis 1:256 aufwiesen, zeigten keine klinischen Krankheitserscheinungen. Dagegen entwickelten alle Schweine schwere Erkrankungssymptome, die zweimal mit schwachvirulentem TGE-Virus immunisiert worden waren und ebenfalls mit hochvirulentem Virus infiziert wurden. Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion lag der SNT-Titer dieser Gruppe mit Werten bis 1:512 höher als in der geschützten Gruppe, jedoch waren in der Serumverdünnung 1:2 keine Ig A-Antikörper nachweisbar. Dies zeigte, daß die Immunität gegen TGE nicht mit dem SNT-Titer, wohl aber mit dem Ig A-Titer parallel ging. Den Hauptgrund dafür, daß nach Immunisierung mit schwachvirulentem TGE-Virus kein Ig A-Titer feststellbar war, vermuteten die Autoren darin, daß es bei einer Empfindlichkeit dieses Virusstammes gegen proteolytische Enzyme nicht zu einer Ig A-Antikörperbildung in den lymphoiden Geweben des Intestinums kommen könnte.

2.3.8. FAMILIE ARENAVIRIDAE

GENUS ARENAVIRUS

REHMAN und WAGNER (1972) gelang in Hamsterseren der Antikörpernachweis gegen das Virus der Lymphozytären Choriomeningitis (LCMV) mittels der

KBR und des SNT. Bei den Nachkommen einer infizierten Hamsterzucht waren komplementbindende Antikörper erstmals bei 6 Wochen alten Tieren demonstrierbar. Die höchsten KBR-Titer traten bei 8 bis 9 Wochen alten Hamstern auf und auch nach 9 Monaten waren noch KBR-Titer von 1:16 vorhanden. Der SNT eignete sich neben dem Antikörpernachweis auch zur Identifizierung von Virusisolaten aus den Hamstergehirnen. Eine sichere Aussage über das Vorliegen einer LCMV-Infektion war jedoch nur über die Kombination von Virusisolierung, SNT und KBR möglich.

REHMAN (1972) prüfte die Möglichkeit, mittels des FAT auf Abklatschpräparaten von Hamsterorganen die Diagnose der LCMV-Infektion zu stellen. Als Vergleichsmethoden wurden ein Mäuseinfektionsversuch mit Organsuspensionen sowie der Antikörpernachweis im Serum durch KBR und SNT herangezogen. Der Mäuseinfektionsversuch stellte sich als nicht empfindlich heraus, da nur einige Tiere starben, andere jedoch trotz nachgewiesener LCMV-Infektion keine klinischen Erscheinungen zeigten. Komplementbindende Antikörper traten in den Seren 7 Wochen alter Hamster auf, erreichten in der 8. bis 10. Lebenswoche ihr Maximum und blieben auf niedrigerem Niveau bestehen. Neutralisierende Antikörper erschienen erst in der 9. Lebenswoche. Zu diesem Zeitpunkt nahm der mittels FAT nachweisbare Virusgehalt der Organe bereits ab. Nur während der 6. bis 10. Lebenswoche war das LCMV regelmäßig in verschiedenen Organen getöteter Hamster demonstrierbar. In diesem Zeitraum war die Diagnose der LCMV-Infektion mittels des FAT innerhalb weniger Stunden möglich.

2.3.9. FAMILIE RETRAVIRIDAE

SUBFAMILIE ONCOVIRINAE

BEHRENS und Mitarb. (1979) prüften einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Enzootischen Leukose des Rindes (BLV) im Vergleich mit der Standardmethode, der ID. Der ELISA sollte als Ergänzungsmethode zur ID dienen, um zweifelhafte Befunde abklären und infizierte Tiere früher erkennen zu können. Beide Ziele wurden mit dem ELISA erreicht. Bei der Untersuchung von 328 Rindern aus leukoseunverdächtigen Beständen wurden 327 der ID-negativen Befunde im ELISA bestätigt. Ein Serum zeigte im ELISA ein positives Ergebnis. Nach 8 Wochen ergab

die ID mit Serum dieses Rindes ein zweifelhaftes Resultat. Bei 381 Rindern aus Beständen mit positiven Reagenten wurden alle 92 positiven und 3 zweifelhaften ID-Befunde auch im ELISA positiv beurteilt, der zusätzlich Antikörper in 2 ID-negativen Seren entdeckte. Von diesen Tieren reagierte eines nach 12 Wochen im ID ebenfalls positiv. Schließlich führten die Autoren eine vergleichende Untersuchung ursprünglich negativ reagierender Rinder aus infizierten Beständen über einen längeren Zeitraum durch. Dabei wurden die Seren im ELISA bis 1:512 und in der ID bis 1:12 titriert. Der ELISA erwies sich als etwa 100mal sensibler und vermochte bei 69% der Tiere Antikörper bis zu 12 Wochen früher als die ID nachzuweisen. Obwohl während des Infektionsverlaufes Titterschwankungen unter die Nachweisgrenze in beiden Verfahren auftraten, konnte der ELISA einen Teil dieser Titerabfälle in der ID aufgrund seiner größeren Empfindlichkeit abfangen. Der ELISA war gut geeignet, zweifelhafte ID-Reagenten endgültig einzustufen und infizierte Tiere früher zu erkennen. Der ELISA hatte jedoch gegenüber der ID den Nachteil, einen größeren Aufwand an Arbeitszeit, Reagenzien und Geräten zu erfordern. Deshalb empfahlen die Autoren, den ELISA zur Nachuntersuchung ID-zweifelhafter Reagenten und von Beständen mit kompliziertem serologischem Reaktionsbild zu verwenden.

Die größere Sensibilität des ELISA bestätigten MANZ (1981) sowie MANZ und Mitarb. (1981), die spezifische Antikörper gegen das BLV in der Milch infizierter Rinder nachweisen konnten. Insgesamt wurden 168 Milchproben von Rindern, die mittels des ELISA in den Seren der betreffenden Tiere Leukosepositiv beurteilt worden waren, mit dem ELISA-Milch-Test untersucht und die Empfindlichkeit dieser Methode mit der ID der Seren verglichen. 128 der 168 als infiziert geltenden Rinder konnten mit der ID entdeckt werden. Der ELISA-Milch-Test wies dagegen 143 Reagenten nach. Die ELISA-Titer des Serums waren mit durchschnittlich 1:512 bis 1:1024 höher als diejenigen der Milch mit durchschnittlich 1:128. Der Vorteil des ELISA-Milch-Testes lag in der einfachen Probengewinnung. Diese Methode könnte nach Ansicht der Autoren aufgrund der Kostenersparnis nach Tilgung der Enzootischen Rinderleukose zur Überwachung der Bestände vorzuziehen sein.

SUBFAMILIE LENTIVIRINAE

HOUWERS und GIELKENS (1979) berichteten über einen ELISA zum Nachweis

von Antikörpern gegen das Visna/Maedi-Virus. Im Vergleich mit den Routinemethoden, der AGP und der KBR, zeigte der ELISA eine weit höhere Sensibilität. Bei der Untersuchung von mehr als 500 Schafseren aus Beständen in den Niederlanden wurden mit der AGP 17,8% und mit der KBR 14,7% der Seren positiv beurteilt. Eine Kombination beider Methoden ergab 20,8% positive Reagenten. Alle positiven Ergebnisse der AGP und der KBR wurden im ELISA bestätigt. Mit dem ELISA konnten darüber hinaus in weiteren 11,7% der Seren spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die Spezifität des ELISA wurde durch negative Resultate mit Seren aus Maedi-freien Beständen und von Schafen, die gegen andere Viren immunisiert wurden, demonstriert. Der ELISA entdeckte Antikörper in Seren experimentell infizierter Schafe ab der 3. Woche p.i.. Die Vorteile des ELISA waren objektive Ablesbarkeit, Benötigung von wenig Antigen und Eignung zu Screening-Tests.

NAKAJIMA (1972) prüfte vergleichend die AGP, die KBR und den SNT zum Antikörpernachweis gegen das Virus der Infektiösen Anämie der Einhufer. Die mit diesen 3 Verfahren gemessenen Antikörper unterschieden sich in dem Zeitpunkt ihrer Bildung als auch in der Dauer ihrer Nachweisbarkeit. In den Seren infizierter Pferde waren präzipitierende Antikörper 2 bis 10 Tage nach der ersten Fieberreaktion demonstrierbar. Zum selben Zeitpunkt setzte auch ein Anstieg des KBR-Titers bis $\geq 1:512$ ein. Neutralisierende Antikörper erschienen erst später, blieben aber auf einem relativ hohen Antikörperspiegel bestehen. Während die komplementbindenden Antikörper in einem kurzen Zeitraum unter die Nachweisgrenze abfielen, persistierten die präzipitierenden Antikörper über ein Jahr.

Die Antikörperantwort von Pferden nach mehrmaliger Immunisierung mit avirulentem Virus der Infektiösen Anämie untersuchte KONO (1972) mittels der KBR und des SNT. 5 der 11 Pferde bildeten komplementbindende Antikörper und alle 11 Tiere zeigten zwischen dem 60. und 140. Tag nach der Erstimpfung neutralisierende Antikörper. Die immunisierten Tiere waren gegen eine Infektion mit dem homologen Virusstamm geschützt, nicht aber gegen heterologe Virusstämme. Während die Belastungsinfektion mit dem homologen Stamm weder auf den Antikörperspiegel in der KBR noch im SNT Einfluß hatte, bewirkte die Belastungsinfektion mit heterologem, virulentem Virus bei 7 von 10 Pferden einen signifikanten Anstieg des KBR-Titers. Bei weiteren 5 Tieren wurde die Immunität nach einer klinisch

manifesten Infektion mit dem Virus der Infektiösen Anämie geprüft. Alle Tiere zeigten sich gegen die Belastungsinfektion resistent, obwohl keines neutralisierende Antikörper gegen das zur Belastungsinfektion verwendete heterologe Virus aufwies. Damit lag die Vermutung nahe, daß für den Infektionsschutz zwei verschiedene Immunmechanismen verantwortlich waren: zum einen die streng typspezifische humorale Immunität nach mehrmaliger Immunisierung mit avirulentem Virus, wobei offensichtlich neutralisierende Antikörper die Hauptrolle spielten, und zum anderen eine vermutlich zelluläre Immunität nach einer "in vivo" Ausbreitung des Virus. Letztere konnte durch Immunsuppressiva und Antilymphozytenserum durchbrochen werden.

WALZEL (1980) prüfte die Möglichkeit des Antikörpernachweises gegen das Virus der Infektiösen Anämie mittels der ID und der antikomplementären Immunofluoreszenz (AKIF). 11 von 500 untersuchten Pferdeseren zeigten präzipitierende Antikörper und 4 Seren ergaben ein ID-zweifelhaftes Ergebnis. Die AKIF bestätigte die 11 positiven Befunde der ID und wies darüberhinaus in einem der zweifelhaften Seren spezifische Antikörper nach. Die 3 anderen fraglichen Seren wurden in der AKIF negativ beurteilt. Bei der Titration von 10 positiven Seren ergaben sich in der ID Titer bis 1:8 und in der AKIF zwischen 1:40 und 1:640. Neben der sehr hohen Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ID schien die AKIF dazu geeignet, zweifelhafte ID-Resultate abzuklären.

2.4. ALLGEMEINE SYNOPSIS DER VERGLEICHENDEN SEROLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Bis vor wenigen Jahren wurden zum Antigen- und Antikörpernachweis in der Virologie bevorzugt die ID, die KBR und der SNT angewendet. Diese Verfahren sind jedoch mit einigen Nachteilen behaftet: so weist die ID eine relativ geringe Sensibilität auf und wird in der Regel lediglich qualitativ durchgeführt. Komplementbindende Antikörper sind meist nur über einen kurzen Zeitraum und in niedrigen Titerstufen nachweisbar. Antikomplementäre oder hämolysierende Eigenschaften können Testseren von der Untersuchung in der KBR ausschließen oder eine Vorbehandlung der Seren erfordern. Der SNT als typspezifischer Test erfaßt zwar sehr feine Immunitätsgrade und ermöglicht die Klassifizierung von Virusisolaten, er wird aber im allgemeinen als arbeits- und zeitaufwendig empfunden. Zudem wird für die Demonstration der Infektiositätsverminderung des Antigen-Antikörpergemisches ein "lebendes System" (Zellkulturen, bebrütete Hühnereier

oder Versuchstiere) mit allen damit verbundenen Schwierigkeiten benötigt.

Die HAH und die IHA zeichnen sich durch eine relativ große Empfindlichkeit und einfache Durchführbarkeit aus. Die Anwendung der HAH ist jedoch nur bei hämagglutinierenden Virusarten möglich und kann zusätzlich durch unspezifische Hämagglutinine oder Inhibitoren eingeschränkt werden.

In den letzten Jahren gewannen der IFAT und die IP-Technik an Bedeutung. Diese Verfahren weisen ebenfalls eine hohe Sensibilität auf, erfordern aber einen ziemlich großen Aufwand an Laborausstattung.

Neuerdings steht mit dem ELISA für einige Virusinfektionen ein Test zur Verfügung, der die Vorteile anderer serologischer Methoden miteinander verbindet. Der ELISA weist eine einfache, schnelle Durchführbarkeit und eine sehr hohe Empfindlichkeit auf. Auch weil dieses Verfahren keine große Laborausstattung benötigt, eignet sich der ELISA zur Untersuchung großer Anzahlen von Testseren. Aufgrund der geringen Ansprüche an die Probenqualität können Antikörper auch in Vollblut, Milch und in hämolytischen Seren nachgewiesen werden.

Eine Synopsis der serologischen Untersuchungsmethoden zur Diagnose der NSD gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Art und Eignung serologischer Untersuchungsmethoden
zum Nachweis von NSDV-Antigen bzw. Antikörpern gegen NSDV

Antigennachweis:

Serologische Untersuchungsmethode					Autoren
AGP	KBR	FAT	IFAT	HA	
+	++			-	TERPSTRA (1969)
		+++			OHDER, LUND und WHITELAND (1970)
-	++	+++	+++		DAVIES, MUNGAI und TAYLOR (1977)
±	++	+++	+++	-	Eignung des Testes

Antikörpernachweis (reziproke Titer):

Untersuchte Tierart	Serologische Untersuchungsmethode					Autoren
	AGP	KBR	IFAT	IHA	SNT	
Maus (Hyperimmunserum)	32	≥640				TERPSTRA (1969)
Schaf, Ziege	*	160			16	
Schaf, Ziege			10*	40960		JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976)
Schaf		256	10240	20480	10	DAVIES, JESSETT und OTIENO (1976)
Schaf, Ziege				20480		JESSETT (1978)
Schaf, Ziege			10240			DAVIES (1978)
Wildtiere		0	20	320		
Ratte			0			

+ ++ +++ +++ ± Eignung des Testes

* Der Test wurde nicht quantitativ ausgeführt

- nicht geeignet, ± Eignung fraglich, + geeignet, ++ gut geeignet,

+++ sehr gut geeignet

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. NSD-VIRUSSTÄMME

Bei meinen Untersuchungen verwendete ich die NSD-Virusstämme I 105 und 045. Sie werden im Institut ständig in Zellkulturen und auf Saugmäusen gezüchtet.

3.2. ZELLKULTUREN

3.2.1. Schafnierenzellen

Nieren frisch geschlachteter Schafe wurden auf die übliche Weise trypsiniert. Etwa 300.000 bis 500.000 Zellen pro ml wurden in Rouxschalen in einer Füllmenge von 100 ml eingesät und mit HEPES¹-gepuffertem Medium 199² (M 199) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum² (fKS) angezüchtet. Nach drei- bis fünftägiger Bebrütung bei 37°C war die primäre Schafnieren(SchN)-Kultur dichtgewachsen. Das Medium wurde entfernt und die Zellen für ein bis zwei Minuten mit phosphatgepufferter Salzlösung³ (PBS) mit einem pH-Wert von 7,2, die 0,05% Trypsin⁴ und 0,02% Äthylen-diamintetraessigsäure¹ enthielt, überschichtet. Nach Entfernung dieser Lösung und 5minütiger Bebrütung der Kultur bei 37°C erfolgte die Suspenderung der Zellen in 15 ml Dimethylsulfoxid(DMSO)-Lösung pro Rouxschale. Die DMSO-Lösung bestand aus 60% M 199, 30% fKS und 10% DMSO⁵. Die Zellsuspension wurde in Volumina von 1 ml bei -80°C aufbewahrt.

¹ Fa. Serva, Heidelberg

² Fa. Seromed, München

³ Zusammensetzung: 40,00 g NaCl
1,00 g KCl
5,75 g Na₂HPO₄ x 2H₂O
1,00 g KH₂PO₄
0,50 g MgCl₂ x 6H₂O
0,50 g CaCl₂ in 5 l Aqua dest.

⁴ Fa. Difco, Detroit, USA

⁵ Fa. Merck, Darmstadt

Zur Anzüchtung von sekundären SchN-Kulturen wurden die eingefrorenen Zellen in warmem Wasser rasch aufgetaut, 1:20 mit M 199 verdünnt und in Kunststoffgefäße¹ eingesät. Die Füllmenge betrug bei Gefäßen mit 80 cm² Bodenfläche 40 ml und bei solchen mit 175 cm² Bodenfläche 80 ml. Nach Vornahme eines Mediumwechsels einen Tag später wuchs der Zellrasen bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C in etwa 3 bis 5 Tagen dicht. Nun erfolgte erneut - wie oben beschrieben - die Ablösung der Zellen von der Gefäßwand. Die Zellsuspension wurde 1:2 bis 1:3 mit M 199 verdünnt und jeweils 2 ml in Leighton-Röhrchen, die 10 x 50 mm große Deckgläschen enthielten, eingefüllt. Bei 37°C wuchsen diese tertiären SchN-Kulturen in etwa 5 Tagen auf den Deckgläschen dicht.

3.2.2. Babyhamsternieren-Zelllinie BHK 13

Mit Eagle's Minimal Essential Medium (MEM)², modifiziert nach DULBECCO, dem 10% fKS und 10% Tryptosephosphatbouillon zugesetzt wurden, erfolgte die Anzüchtung der Babyhamsternieren-Zelllinie BHK 13 in den oben genannten Kunststoffgefäßen. Die Bebrütung bei 37°C führte nach etwa 3 Tagen zu einem dichten Zellrasen. Mit Erhaltungsmedium, das aus M 199 mit 10% fKS bestand, waren die Kulturen bei 30°C mindestens 2 Wochen haltbar. Zur Subkultivierung wurden die Zellen - wie beschrieben - abgelöst und 1:6 mit Eagle's MEM verdünnt.

3.3. NSD-VIRUSVERMEHRUNG

3.3.1. Virusvermehrung in Zellkulturen

3.3.1.1. Virusvermehrung in tertiären Schafnierenzellen

Nach dem Dichtwachsen der tertiären SchN-Kulturen wurde das Medium entfernt und 2 ml einer 1:10 mit Medium verdünnten Virussuspension (Titer ca. 5×10^5 LD₅₀/ml) in jedes Leighton-Röhrchen gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte nicht. Die Bebrütung erfolgte 4 Tage lang bei 37°C, bis die Deckgläschen für den IFAT entnommen und weiter präpariert werden konnten. Ein cpE war zu diesem Zeitpunkt zu etwa 50% eingetreten.

¹ Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark

² Fa. Seromed, München

3.3.1.2. Virusvermehrung in der Zelllinie BHK 13

Die Entfernung des Mediums erfolgte, sobald der Zellrasen in Gefäßen mit 175 cm² Bodenfläche dichtgewachsen war. Zur Beimpfung wurden die Zellen mit 10 ml NSD-Virussuspension (Titer ca. 5×10^5 LD₅₀/ml) und 50 ml Erhaltungsmedium pro Gefäß überschichtet und zur Virusadsorption 3 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung der Suspension wuschen wir die Kultur einmal mit Erhaltungsmedium und gaben davon dann 60 ml wiederum zu. Die Bebrütung erfolgte bei 30°C. Am 4. Tag p.i. konnten die infizierten Zellen für die serologischen Tests gewonnen werden.

Für Viruspassagen brachen wir die Virusvermehrung am 4. Tag p.i. durch Einfrieren der Kultur bei -20°C ab. Nach dem Auftauen, wobei die Zellen in angetautem Zustand durch Schütteln vom Gefäßboden abgelöst wurden, führten wir Passagen auf übliche Weise durch.

Folgende Viruspassagen dienten im Laufe meiner Untersuchungen zur Herstellung von NSD-Virusantigen:

Virusstamm_I_105:

83. SchN-Passage

5. - 7. BHK-Passage

71. BHK-Passage

Virusstamm_045:

89. - 94. SchN-Passage

6. BHK-Passage

10. BHK-Passage

13. - 19. BHK-Passage

3.3.2. Virusvermehrung in Saugmäusen

3.3.2.1. Virustitrationen

Unsere NSD-Virusstämme verursachten in der Zelllinie BHK 13 keinen cpE. Deshalb erfolgte die Titration der Virusmaterialien (Zellkulturen, Saugmausgehirnsuspension, Schafseren) durch Verimpfung auf Saugmäuse. Der Virustiter wurde als letale Dosis für 50% der Mäuse (LD₅₀) mit der Methode nach KÄRBER (1931) ermittelt. Zu diesem Zweck legten wir eine Verdünnungsreihe des Virusmaterials mit Eagle's MEM in Zehnerpotenzen an und inokulierten pro Verdünnungsstufe 4 bis 6 Saugmäuse im Alter von 1 bis 3 Tagen mit je 0,02 ml intracerebral (i.c.). Nach dem 2. Tag p.i.

auftretende Todesfälle galten als spezifisch. Der Beobachtungszeitraum betrug 14 Tage p.i..

3.3.2.2. Gewinnung von NSDV-haltigen Gehirnsuspensionen

Die Gewinnung von NSDV-haltigen Saugmausgehirn(SMG)-Suspensionen erfolgte in Anlehnung an die von JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976) beschriebene Methode. Saugmäuse, die nach Infektion mit dem NSDV-Stamm I 105 klinische Symptome zeigten, wurden getötet. Wir ernteten die Gehirne unter antiseptischen Bedingungen, froren sie ein und homogenisierten sie beim Auftauen in einer Reibschale mit einem Pistill. Dieses Homogenisat wurde 10%ig in PBS suspendiert und eine Minute lang im Eiswasserbad mit einem Ultraturrax¹ behandelt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 750 g gewannen wir den Oberstand und bewahrten ihn bei -80°C auf. Eine auf die gleiche Weise aus nur mit Eagle's MEM inokulierten Mäusegehirnen hergestellte Suspension diente als Kontrolle.

3.4. VERSUCHSTIERE

3.4.1. Schafe

3.4.1.1. Schafe zur Gewinnung von Immunseren

Zur Gewinnung von NSD-Immunseren dienten 3 männliche Schafe der Rasse "Merinolandschaf". Die Tiere (Nr. 1 bis 3) stammten von einem Zuchtbetrieb bei München. Sie waren etwa 4,5 Monate alt, 35 kg schwer und mit Silage und Heu gefüttert worden. Die Schafe wurden einzeln in Boxen auf Einstreu gehalten. Kraftfutter² für Schafe, Heu und Wasser standen ihnen ad libitum zur Verfügung. Die Isolationsmaßnahmen nach der Infektion der Tiere schlossen Kleidungswechsel bei Betreten und Verlassen des Stalles, Desinfektion des Dungs, unschädliche Beseitigung der Tierkörper und eine Schlußdesinfektion nach veterinärpolizeilichen Vorschriften ein.

¹ Fa. Janke und Kunkel

² Fa. Altromin

3.4.1.2. Schafe zur Gewinnung von Erythrozyten

Die Erythrozyten für die IHA wurden aus dem Blut dreier separat gehaltenen, gesunder männlicher Schafe der Rasse "Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf" gewonnen. Die 3,5 Monate alten Tiere wogen etwa 30 kg.

3.4.2. Kaninchen

3 weibliche Kaninchen der Rasse "Weiße Deutsche Riesen" (Kaninchen I bis III) standen zur Gewinnung von Hyperimmunsereen zur Verfügung. Die ausgewachsenen Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten und mit Kaninchen-Alleinfutterpellets¹ und Wasser ad libitum versorgt. Je ein weibliches Kaninchen diente zur Normalserumgewinnung (keine Immunisierung) bzw. als Kontrolltier (Inokulation mit Normalantigen).

3.4.3. Mäuse

Zu Virustitrationen und zur Gewinnung von Saugmausgehirnen verwendeten wir Mäuse (Stamm NMRI) aus institutseigener Zucht. Jeweils ein Muttertier mit einem Wurf wurde in einem Makrolonkäfig gehalten. Sie waren im Kleintierisolierrstall untergebracht. Alleinfutterpellets¹ und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

3.5. IMMUNISIERUNG DER VERSUCHSTIERE

3.5.1. Infektion von Schafen

Die Infektion erfolgte subkutan (s.c.) in die rechte Kniefalte. Dabei erhielten Schaf 1 und 3 je 10^6 LD₅₀ des originären NSD-Virusstammes 045, Schaf 2 2×10^6 LD₅₀ der 91. SchN-Passage des NSD-Virusstammes 045. Das Infektionsmaterial für die Schafe 1 und 3 lag in gefriergetrockneter Form vor. Es wurde unmittelbar vor der Infektion mit jeweils 5 ml PBS gelöst.

Da Schaf 2 keine klinischen Symptome bis zum 7. Tag p.i. zeigte, erhielt es an diesem Tag 5 ml Serum von Schaf 1 (5. Tag p.i.) subkutan verabreicht. Bei allen Tieren wurde täglich die Körpertemperatur gemessen und klinische Symptome erfaßt.

¹ Fa. Altromin

Um eine Virämie und damit eine erfolgreiche Infektion nachzuweisen, entnahmen wir den Tieren während der Fieberreaktion Blut und verimpften das daraus gewonnene Serum auf Saugmäuse (siehe 3.3.2.1.). Dies geschah bei Schaf 1 mit Serum vom 5. Tag p.i., bei Schaf 2 vom 11. Tag p.i. (entsprechend dem 4. Tag post reinfectionem) und bei Schaf 3 vom 4. Tag p.i..

3.5.2. Immunisierung von Kaninchen

Entsprechend den Angaben von JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976) immunisierten wir die Kaninchen mit NSDV-haltiger SMG-Suspension. Diese war mit Freund'schem inkomplettem Adjuvans¹ im Verhältnis 1:1 gemischt. Drei Kaninchen erhielten s.c. jeweils 1 ml dieser Mischung auf 10 Körperstellen verteilt und intramuskulär (i.m.) 3 ml auf 4 Körperstellen verteilt appliziert. Diese Immunisierung wiederholten wir nach 3 und 36 Wochen. Ein Kaninchen erhielt als Kontrolltier auf die gleiche Weise Normal-SMG-Suspension.

3.5.3. Serumgewinnung von immunisierten Tieren

Jeweils 10 ml Blut entnahmen wir bei Schafen aus der Vena jugularis bzw. bei Kaninchen aus der medialen Ohrarterie und bewahrten es zur Gerinnung mehrere Stunden lang bei 4°C auf. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 2200 g wurde das überstehende Serum gewonnen, portioniert und bis zur Untersuchung bei -20°C eingefroren.

Blutentnahmen zur Serumgewinnung erfolgten bei den Kaninchen in der 3. Woche p.i. und ab der 5. Woche p.i. zunächst in einwöchigen, später in zweiwöchigen Abständen.

Schafseren gewannen wir am 12., 14., 18. und 26. Tag p.i.. Von den Schafen 1 und 2 wurde zusätzlich Serum vom 33. Tag p.i. und von Schaf 3 vom 7. Tag p.i. untersucht.

¹ Fa. Difco, Detroit, USA

3.6. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Neben den Immunseren der Versuchstiere untersuchten wir außerdem folgende Seren:

3.6.1. Aus Afrika stammende Schafseren

Aus Kenya standen uns als Positivkontrollen die Seren von 2 natürlich an NSD erkrankten und genesenen Schafen zur Verfügung, die wir als "Kontrollserum 1 bzw. 2" bezeichneten. Näheres zur Vorgeschichte war trotz intensiver Bemühungen nicht zu erfahren.

Des weiteren erhielten wir von dort insgesamt 427 Seren adulter Schafe zur Untersuchung.¹ Sie stammten von der Farm Lewa Down bei Isiolo (20 Seren), aus der Gegend von Naivasha (220 Seren) und von Molo/Grassland (187 Seren). Auch hier waren weitere Angaben über die Seren nicht erhältlich.

50 Seren stammten aus der Republik Südafrika². Es handelte sich um 43 Seren von Dorper-Schafen beiderlei Geschlechts aus Kenhardt, Kapprovinz und 7 Seren von weiblichen Merinoschafen aus Middelburg, ebenfalls Kapprovinz. Alle Tiere waren zwischen 16 und 27 Monaten alt und extensiv auf Weidefläche gehalten worden.

3.6.2. Normalseren

Als Normalseren dienten die vor der Immunisierung der Versuchstiere gewonnenen Seren und die Seren mehrerer institutseigener Schafe und Kaninchen, die noch in keinem Versuch standen und räumlich getrennt von unseren Versuchstieren untergebracht waren.

3.6.3. Humanseren

Insgesamt 6 Seren von Mitarbeitern des Instituts bzw. von Kontrollpersonen, die mit Sicherheit nie Kontakt mit NSDV hatten, untersuchten wir ebenfalls auf Antikörper.

Wir danken Dr. R. HEINONEN, z.Z. Veterinary Research Laboratory, Kabete, Kenya¹ und Dr. B. Erasmus, Veterinary Research Institute, Onderstepoort, Republik Südafrika² für die Überlassung der Seren.

3.7. SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

3.7.1. Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT)

3.7.1.1. Deckglasmethode

Am 4. Tag p.i. entnahmen wir die Deckgläschen aus den Leighton-Röhrchen, tauchten sie zur Entfernung des Mediums dreimal in PBS und fixierten sie nach Lufttrocknung 10 Minuten lang in -20°C kaltem Aceton. Anschließend wurden die Deckgläschen 30 Minuten lang luftgetrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

Von den zu untersuchenden NSD-Immunseren fertigten wir eine Zweifachverdünnungsreihe in IFAT-PBS¹, beginnend bei 1:16, an und gaben jeweils 0,025 ml einer Serumverdünnungsstufe auf ein fixiertes Deckgläschen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei der Suspensionsmethode.

Die Deckglasmethode führte ich nur am Anfang meiner Untersuchungen durch. Nachdem sich die Suspensionsmethode als genauso geeignet, jedoch arbeits- und materialsparend erwiesen hatte, verwendete ich nur noch dieses Verfahren.

3.7.1.2. Suspensionsmethode

3.7.1.2.1. Antigenbeschichtung

Am 4. Tag p.i. wurde das Medium von der BHK-Zellkultur abgesaugt, der infizierte Zellrasen mittels eines Schabers vom Gefäßboden abgelöst und die Zellen eines 175 cm^2 -Gefäßes in 5 ml PBS suspendiert. Nachdem wir jeweils einen Tropfen dieser Zellsuspension auf die dafür vorgesehenen Antigenfelder von Objektträgern² gegeben hatten, fixierten wir diese nach 30minütiger Lufttrocknung 10 Minuten lang in -20°C kaltem Aceton und bewahrten sie nach erneuter Lufttrocknung bis zur Färbung bei -20°C auf.

¹ Phosphatpuffer-Konzentrat, Behringwerke, Marburg; 1:20 mit Aqua dest. verdünnt

² Fa. Fresenius, Bad Homburg

3.7.1.2.2. Färbung

Jedes Antigenfeld eines Objektträgers überschichteten wir mit je 0,010 ml einer Serumverdünnungsstufe. Von den aus Afrika stammenden Seren wurden als Suchtest die Verdünnungsstufen 1:32 und 1:64 untersucht und erst bei positivem Befund anschließend der Antikörpergehalt dieser Seren ausgetitriert. Nach einer 45minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Objektträger dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen, luftgetrocknet und jedes Antigenfeld mit 0,010 ml Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-markiertem Antispeziesglobulin überschichtet. Nun inkubierten wir erneut 45 Minuten lang bei 37°C, wuschen die Objektträger dreimal 5 Minuten in PBS und tauchten sie zweimal 2 Minuten in Aqua dest.. Die Einbettung erfolgte mit Glycerin¹, das im Verhältnis 9:1 mit IFAT-PBS gemischt war (pH-Wert 7,4 bis 8,0).

3.7.1.2.3. Antispeziesglobuline

Folgende FITC-markierte Antispeziesglobuline fanden Anwendung:

Fluorescein Conjugated IgG Fraction Rabbit Anti-Sheep IgG,

Fa. Cappel, Cochranville, USA

Globulines Fluorescentes De Mouton Anti Ig De Lapin,

Institut Pasteur, Paris, Frankreich

Anti-human IgG antibodies, fluorescein labelled,

Institut Pasteur, Paris, Frankreich

Das gefriergetrocknete Antischafglobulin wurde mit dem vom Hersteller angegebenen Volumen Aqua dest. aufgelöst und in Portionen von 0,050 ml bei -20°C aufbewahrt. Zur Färbung verdünnten wir die Konjugate 1:30 mit IFAT-PBS und setzten einige Tropfen "Evans blue" zu.

3.7.1.2.4. Auswertung

Die Betrachtung der gefärbten Präparate erfolgte in einem Fluoreszenzmikroskop² bei der Filterkombination 3/3 und 252facher Gesamtvergrößerung.

¹ Fa. Merck, Art. Nr. 4095

² Orthoplan, Fa. Leitz, Wetzlar; Auflichtfluoreszenz

Als IFAT-Titer wurde die höchste Serumverdünnungsstufe angesehen, die noch eine deutliche zytoplasmatische Fluoreszenz bewirkte.

3.7.1.3. Kontrollfärbungen

Bei jedem Testansatz wurde ein Normalserum der untersuchten Tierart und ein sicher IFAT-positives Antiserum, dessen Antikörpertiter durch mehrmalige Untersuchungen bekannt war, mitgeführt.

Als weitere Negativkontrollen überschichteten wir einige Antigenfelder mit IFAT-PBS statt Serum oder färbten sie direkt - ohne vorherige Serum-Überschichtung - mit Konjugat. Daneben wurden nichtinfizierte Zellkulturen auf die gleiche Weise wie infizierte gefärbt.

Schließlich führten wir zur Überprüfung der Spezifität der fluoreszierenden Antikörper einen IFAT-Hemmungstest durch, wobei wir die einzelnen Serumverdünnungsstufen vor der Untersuchung mit einer NSD-Virussuspension (siehe unten) im Verhältnis 1:1 mischten und eine Stunde lang bei 37°C inkubierten. Der IFAT-Titer dieses virusbehandelten Serums wurde im Vergleich zum unbehandelten Serum ermittelt.

Die Herstellung der NSD-Virussuspension erfolgte auf folgende Weise: Von einer infizierten BHK-Zellkultur wurde am 4. Tag p.i. das Medium abgesaugt, die Zellen eines 175 cm²-Gefäßes in 5 ml PBS suspendiert und dreimal eine Minute lang im Eiswasserbad ultraschallbehandelt.¹ Nach 20minütiger Zentrifugation bei 2200 g verwendeten wir den Überstand zur Mischung mit den Seren.

3.7.1.4. NSDV-Antigennachweis im Saugmausgehirn

Zum Nachweis von NSDV-Antigen mittels des IFAT töteten wir am 6. Tag p.i. schwer erkrankte Saugmäuse, die am 2. Lebenstag mit je 0,02 ml der 1:10 mit Eagle's MEM verdünnten 71. BHK-Passage des NSD-Virusstammes I 105 i.c. infiziert worden waren, und froren die Köpfe in flüssigem Stickstoff bei -193°C ein. Von diesen Köpfen fertigten wir bei -28°C eine Serie von 6 bis 10 µm dicken frontalen Gefrierschnitten² an und brachten sie auf gereinigte Objektträger. Jeden 3. Schnitt färbten wir mit Hämatoxylin-

¹ Sonifier Ultraschall-Desintegrator, Fa. Branson

² Cryo-cut Microtome, American Optical Corporation

Eosin; die anderen Gefrierschnitte wurden 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur in Aceton fixiert und zum IFAT benutzt. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte wie beim Antikörpernachweis (siehe 3.7.1.2.2.). Dabei wurden die Gefrierschnitte im ersten Reaktionsschritt mit Serum von Schaf 2 (33. Tag p.i.; 1:64 mit IFAT-PBS verdünnt) und im zweiten Reaktionsschritt mit FITC-markiertem Antischafglobulin überschichtet.

Als Kontrollen färbten wir zum einen Gefrierschnitte aus nichtinfiziertem SMG auf die gleiche Weise und zum anderen Schnitte aus NSDV-infiziertem SMG im ersten Reaktionsschritt mit Normalserum (Serum von Schaf 2 vor der Infektion) anstelle von Antiserum.

3.7.2. Indirekte Hämagglutination (IHA)

3.7.2.1. Antigengewinnung

Das Prinzip der Antigengewinnung für die IHA übernahmen wir von JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976).

Am 4. Tag p.i. wurde das Medium von infizierten BHK-Zellkulturen gewonnen, der Zellrasen mittels eines Schabers vom Gefäßboden abgelöst und die Zellen eines 175 cm²-Gefäßes in 10 ml Medium suspendiert. Nach einer dreimal eine Minute lang im Eiswasserbad vorgenommenen Ultraschallbehandlung gaben wir das restliche Medium wieder zu und zentrifugierten die Suspension 20 Minuten lang bei 2200 g. Den Oberstand mischten wir mit einer 50%igen Stammlösung von Polyethylenglykol¹ (PEG) in einem solchen Volumen, daß die PEG-Konzentration in der Mischung 6% betrug. Diese Mischung wurde über Nacht bei 4°C auf einem Magnetrührer gerührt und dann eine Stunde lang bei 2200 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Oberstandes suspendierten wir den Niederschlag mit 1/25 des ursprünglichen Mediumvolumens PBS. Das so gewonnene Antigen wurde - wie oben beschrieben - ultraschallbehandelt, etwa 24 Stunden lang gegen PBS dialysiert und 1:5 mit PBS verdünnt.

Normalantigen zur Spezifitätskontrolle der IHA stellten wir auf die gleiche Weise aus nichtinfizierten Zellkulturen her.

¹ PEG mit Molekulargewicht 6000, Fa. Merck; 50%ige Lösung in 0,1 m Trispuffer (Trishydroxymethylaminomethan) pH 7,6; 15 Minuten bei 120°C und 1,2 bar sterilisiert

3.7.2.2. Erythrozyten

3.7.2.2.1. Gewinnung der Erythrozyten

Die Gewinnung und Stabilisierung der Erythrozyten für die IHA erfolgte nach der bei MAYR und Mitarb. (1977) angegebenen Methode.

Blut dreier Hammel (jeweils 100 ml) wurde in einem gleich großen Gesamtvolumen Alsever's Lösung¹ aufgefangen, die Mischung über Nacht bei 4°C gehalten und anschließend durch Gaze geseiht. Die Erythrozyten zentrifugierten wir 10 Minuten lang bei 400 g ab und suspendierten sie nach Verwerfen des Oberstandes in PBS. Nach erneuter Zentrifugation wiederholten wir diesen Waschvorgang noch zweimal und stellten schließlich eine 10%ige Erythrozytensuspension in PBS her.

3.7.2.2.2. Stabilisierung der Erythrozyten

Die 10%ige Erythrozytensuspension mischten wir mit 1/4 Volumen einer 1%igen Glutaraldehydlösung² in PBS, hielten sie unter mehrmaligem Schütteln eine Stunde lang bei Zimmertemperatur und seichten sie durch Gaze. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 400 g wurden die Erythrozyten - wie oben beschrieben - fünfmal in PBS gewaschen, 50%ig in Aqua dest., das 0,05% bovines Serumalbumin³ enthielt, suspendiert und in Volumina von 2 ml in Glasgefäßen gefriergetrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

3.7.2.2.3. Tanninbehandlung und Antigensensibilisierung der Erythrozyten

Die Tanninbehandlung der Erythrozyten und die Antigensensibilisierung wurde nach HERBERT (1978) vorgenommen.

Gefriergetrocknete Erythrozyten lösten wir mit 5 ml Aqua dest. je Gefäß auf, hielten sie über Nacht bei 4°C und suspendierten sie in etwa 20 ml PBS. Anschließend zentrifugierten wir sie 5 Minuten lang bei 750 g ab und wiederholten diesen Waschvorgang noch zweimal. Schließlich wurde

¹ Zusammensetzung: 20,50 g Dextrose, 8,00 g Natriumzitrat, 4,2 g Natriumchlorid und 0,55 g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest.

² Fa. Serva, Heidelberg

³ Fa. Biomol, Ilvesheim

eine 6%ige Erythrozytensuspension in PBS hergestellt und diese durch Gaze geseiht. Danach mischten wir die Suspension mit einem gleich großen Volumen einer PBS, die Tannin¹ in einer Verdünnung von 1:10000 enthielt, und zentrifugierten die Erythrozyten nach einer 15minütigen Inkubation bei 37°C ab. Die tanninbehandelten Erythrozyten wurden einmal mit PBS gewaschen und erneut 6%ig in PBS suspendiert.

Diese Erythrozytensuspension mischten wir mit einem gleich großen Volumen des 1:5 mit PBS verdünnten Antigens (siehe 3.7.2.1.) und inkubierten 30 Minuten lang bei 37°C. Danach wurden die Erythrozyten 5 Minuten lang bei 750 g abzentrifugiert, in PBS, die 1% inaktiviertes und absorbiertes (siehe 3.7.2.3.) normales Kaninchenserum enthielt, suspendiert und dreimal in diesem Puffer gewaschen. Schließlich stellten wir eine 1%ige Suspension der antigensensibilisierten Erythrozyten in demselben Puffer her.

Aus Normalantigen, das aus nichtinfizierten BHK-Zellkulturen gewonnen worden war, bereiteten wir auf die gleiche Weise eine 1%ige normalantigensensibilisierte Erythrozytensuspension in PBS mit 1% normalem Kaninchenserum.

3.7.2.3. Serumvorbehandlung

Alle in der IHA untersuchten Seren und das normale Kaninchenserum, das als Pufferzusatz diente, wurden zuvor 30 Minuten lang bei 56°C inaktiviert und auf folgende Weise absorbiert: Zugabe eines gleich großen Volumens einer dreimal in PBS gewaschenen 10%igen Hammelerythrozytensuspension zum Serum, Inkubation über eine Stunde bei 37°C; es folgte eine Zentrifugation über 5 Minuten bei 750 g, schließlich Abnahme des Überstehenden, 1:2 vorverdünnten Serums.

3.7.2.4. Testdurchführung

In den U-förmigen Vertiefungen von Mikrotiterplatten² wurden Serumverdünnungsreihen mit PBS, die 1% normales Kaninchenserum enthielt, angelegt, wobei wir in der untersten Plattenreihe mit der Verdünnungsstufe 1:8 begannen. Den folgenden Reihen, d.h. ab der Verdünnung 1:16, gaben wir je einen Tropfen der 1%igen antigensensibilisierten Erythrozyten-

¹ Fa. Serva

² Fa. Greiner, Nürtingen

suspension zu. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte auf einem Rüttler etwa 30 Sekunden lang geschüttelt und bis zur Ablesung über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Als IHA-Titer sahen wir die höchste Serumverdünnungsstufe an, die noch eine deutliche Hämagglutination bewirkte.

3.7.2.5. Kontrollreaktionen

Bei jedem Testansatz wurde sowohl ein Normalserum der untersuchten Tierart als auch ein sicher positives Antiserum mit mehrmals bestimmtem IHA-Antikörpertiter mitgeführt.

Zum Ausschluß einer Hämagglutination durch heterologe Normalantikörper gaben wir zu der Verdünnungsstufe 1:8 jedes Testserums einen Tropfen einer 1%igen nichtsensibilisierten Erythrozytensuspension in PBS.

Das eventuelle Vorkommen von Spontanagglutinationen der sensibilisierten bzw. nichtsensibilisierten Erythrozyten überprüften wir, indem wir bei jedem Testansatz ein Serum durch Serumverdünnungsmittel ersetzten. Als Spezifitätskontrolle der Hämagglutination dienten ferner Testansätze, bei denen statt der virusantigensensibilisierten Erythrozytensuspension eine normalantigensensibilisierte zugetropft wurde.

Schließlich führten wir IHA-Hemmungsteste durch, bei denen die Serumverdünnungsstufen vor der Zugabe der Erythrozyten mit einer NSD-Virussuspension 1:1 gemischt und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert wurden. Die Herstellung der NSD-Virussuspension erfolgte auf die gleiche Weise wie für den IFAT-Hemmungstest (siehe 3.7.1.3.).

3.7.3. Indirekter Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die indirekte ELISA-Technik zum Nachweis NSDV-spezifischer Antikörper führte MEIER (1982) durch.

4. ERGEBNISSE

4.1. VIRUSTITRATIONEN

Zellkulturmaterial:

Von folgenden NSDV-Zellkulturpassagen, die zur Antigengewinnung für die serologischen Untersuchungen dienten, bestimmten wir die Titer:

NSD-Virusstamm I 105:

83. SchN-Passage: $5 \times 10^{6,1}$ LD₅₀/ml

5. BHK-Passage: $5 \times 10^{5,5}$ LD₅₀/ml

NSD-Virusstamm 045:

93. SchN-Passage: $5 \times 10^{5,25}$ LD₅₀/ml

6. BHK-Passage: $5 \times 10^{4,3}$ LD₅₀/ml

13. BHK-Passage: $5 \times 10^{5,1}$ LD₅₀/ml

14. BHK-Passage: $5 \times 10^{6,0}$ LD₅₀/ml

Einen cpE bewirkten beide Virusstämme nur auf SchN-Kulturen. Etwa am 3. Tag p.i. traten Plasmabrücken zwischen den Zellen auf, sodaß der Zellrasen an den betreffenden Stellen ein netzförmiges Aussehen erhielt. In zunehmenden Maße zeigten sich Vakuolen im Zytoplasma; die Zellen kugelten sich ab und lösten sich schließlich aus dem Zellrasen.

SMG-Suspension:

Die zur Immunisierung der Kaninchen verwendete NSDV-haltige SMG-Suspension wies einen Titer von $5 \times 10^{5,0}$ LD₅₀/ml auf.

Schafseren:

Die Seren der Schafe, die während der Fieberreaktion nach der Infektion gewonnen wurden, zeigten folgende Titer:

Serum von Schaf 1 (5. Tag p.i.): $5 \times 10^{4,3} \text{ LD}_{50}/\text{ml}$

Serum von Schaf 2 (4. Tag post
reinfectionem): $5 \times 10^{3,3} \text{ LD}_{50}/\text{ml}$

Serum von Schaf 3 (4. Tag p.i.): $5 \times 10^{5,5} \text{ LD}_{50}/\text{ml}$

4.2. SYMPTOMATIK DER NSD-INFEKTION

4.2.1. Saugmäuse

Bei Infektionen mit niedrigen Virusverdünnungsstufen war häufig ein perakuter Verlauf mit Todesfällen ohne vorherige deutliche Erkrankungszeichen zu beobachten. Typisch war jedoch das folgende Krankheitsbild:

Etwa ab dem 5. Tag p.i. begannen die infizierten Saugmäuse zu zittern. Sie saugten nicht mehr und blieben in der Entwicklung zurück. Schon ein bis 2 Tage später zeigten die Tiere Zyanose. Sie starben schließlich meist zwischen dem 5. und 14. Tag p.i. unter starker Atemnot und Streckkrämpfen besonders der Hintergliedmaßen. Letztere waren durch Berührung auch willkürlich auslösbar.

4.2.2. Schafe

Bei Schaf 1 trat am 4. Tag p.i. Fieber von $41,7^{\circ}\text{C}$ auf. Nach einem Maximum von $42,3^{\circ}\text{C}$ am 6. Tag p.i. sank die Körpertemperatur langsam ab, um am 11. Tag p.i. wieder Normalwerte zu erreichen. Apathie, Freßunlust, erhöhte Atemfrequenz und wässriger, übelriechender Durchfall waren ab dem 6. Tag p.i. zu beobachten. Am 10. Tag p.i. besserten sich das Allgemeinbefinden und die Futteraufnahme wieder; Diarrhoe war bis zum 14. Tag p.i. vorhanden.

Schaf 2 reagierte am 2. Tag nach der Inokulation mit Serum von Schaf 1 (entsprechend dem 9. Tag p.i.) mit einer erhöhten Körpertemperatur von $41,3^{\circ}\text{C}$. Das Fieber erreichte 2 Tage später mit $42,3^{\circ}\text{C}$ den höchsten Wert und fiel weitere 2 Tage danach auf Normaltemperatur zurück. Während der Fieberperiode zeigte das Tier Apathie und verringerte Freßlust, während eine Diarrhoe nicht zu beobachten war.

Schaf 3 zeigte vom 2. bis zum 8. Tag p.i. Fieber, das am 4. Tag p.i. auf einen Maximalwert von $41,9^{\circ}\text{C}$ anstieg. Zu diesem Zeitpunkt traten auch gestörtes Allgemeinbefinden und Inappetenz auf. Eine teilweise blutige Diarrhoe setzte am 5. bis 6. Tag p.i. ein. Am 8. Tag p.i. bestand starker, übelriechender Durchfall, der Beimengungen von Schleim und Blut aufwies. Diese Blutbeimengungen konnten mit dem Hämo-cult-Test bestätigt werden. Das Befinden des Tieres besserte sich am 9. Tag p.i.; die Diarrhoe war am 11. Tag p.i. überwunden.

4.3. SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

4.3.1. IFAT

4.3.1.1. Antikörnernachweis

4.3.1.1.1. Kontrollfärbungen

Infizierte Zellen, die mit IFAT-PBS anstelle von Antiserum oder ohne vorherige Serumüberschichtung direkt mit Konjugat gefärbt wurden, zeigten als Negativkontrollen ein völliges Ausbleiben von Fluoreszenz. Aufgrund der Gegenfärbung mit Evans blue stellten sich die Zellen rötlich auf schwarzbraunem Hintergrund dar. Das gleiche Bild war bei Kontrollfärbungen von nichtinfizierten Zellen mit Antiserum zu beobachten.

Bei Verwendung von Normalseren anstelle von Antiseren im ersten Reaktionsschritt trat eine schwache unspezifische grünliche Fluoreszenz in infizierten Zellen maximal bis zur Serumverdünnungsstufe 1: 16 auf. Aus diesem Grund wurden nur IFAT-Titer von $\geq 1:32$ als spezifisch betrachtet.

NSDV-Antiseren von Kaninchen und Schafen bewirkten eine sehr deutliche, strahlend gelbgrüne Immunofluoreszenz, die streng auf das Zytoplasma der infizierten Zellen begrenzt war. Diese spezifische Fluoreszenz war feinkörnig, zum Teil auch zusammenfließend und meist über das gesamte Zytoplasma gleichmäßig verteilt, während der Zellkern stets als dunkler, von der Fluoreszenz völlig ausgesparter Bezirk klar zu erkennen war. Fluoreszierende Zellen hoben sich eindeutig von nicht antigenhaltigen Zellen und dem dunklen, ungefärbten Hintergrund ab. Durch die 4 Tage lang währende Virusvermehrung betrug der Anteil fluoreszierender Zellen immer mindestens 80%.

Mit dem IFAT-Hemmungstest konnten wir die Spezifität der Immunofluoreszenz besonders eindrucksvoll nachweisen: durch die Mischung von Antiseren mit einer NSD-Virus suspension (siehe 3.7.1.3.) verringerte sich deren IFAT-Titer um mindestens 2 Verdünnungsstufen.

4.3.1.1.2. Immuneren von Kaninchen

3 Wochen p.i. war ein IFAT-Titer von 1:128 (Kaninchen I und III) bzw. 1:64 (Kaninchen II) feststellbar. 5 Wochen p.i. (2 Wochen nach der ersten Boosterung) stieg der Titer auf 1:1024 (Kaninchen I und III) bzw. 1:512 (Kaninchen II), fiel aber bereits eine Woche später um eine Stufe ab. Danach erfolgte ein langsames Absinken des Antikörperspiegels auf 1:128 in der 33. Woche p.i. (Kaninchen I und III). Kaninchen II war in der 15. Woche p.i. interkurrent verstorben. Die zweite Boosterung in der 36. Woche p.i. bewirkte einen schnellen Anstieg auf 1:1024 bei beiden Tieren. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes in der 45. Woche p.i. verringerte sich der Titer um eine Stufe.

4.3.1.1.3. Seren experimentell infizierter Schafe

Spezifische NSDV-Antikörper waren im Serum von Schaf 1 mittels des IFAT erstmals am 12. Tag p.i. bis zur Verdünnungsstufe 1:64 nachweisbar. Bereits am 14. Tag p.i. wurde der höchste Titer von 1:128 erreicht; er war bis zum 33. Tag p.i. zu beobachten.

Auch im Serum von Schaf 2 trat am 12. Tag p.i. ein Antikörpertiter von 1:64 auf. Am 26. Tag p.i. (19. Tag post reinfectionem) stieg der Antikörperspiegel auf 1:128 und blieb auf dieser Höhe bis zum 33. Tag p.i. feststellbar. Schaf 3 zeigte am 12. Tag p.i. einen IFAT-Titer von 1:32, der zwei Tage später auf 1:64 anstieg, um anschließend bis zum 26. Tag p.i. auf dieser Höhe bestehen zu bleiben.

4.3.1.1.4. Immunseren von Schafen aus Kenya

In beiden Seren der von NSD genesenen Schafe waren IFAT-Titer von 1:64 zu beobachten.

4.3.1.1.5. Aus Afrika stammende Schafseren

Von den 427 aus Kenya stammenden Schafseren wurden fluoreszenzserologisch 229 (53,6%) als positiv und 198 (46,4%) als negativ beurteilt. Dabei stellten wir in 120 Seren einen Titer von 1:32, in 87 Seren Werte von 1:64, in 18 Seren solche von 1:128 und in 4 Seren Titer von 1:256 fest. Als positiv galten Titer von $\geq 1:32$.

Der Anteil positiver Seren war mit 83,6% in den aus Naivasha stammenden Seren am höchsten. Seren von der Farm Lewa Down bei Isiolo enthielten zu 45,0% und Seren aus Molo/Grassland nur zu 19,3% im IFAT nachweisbare Antikörper.

Eine Übersicht über die Titerverteilung und Summe der IFAT-negativen bzw. positiven Seren der einzelnen Gebiete Kenyas ist in Tabelle 2 dargestellt.

In den 50 Schafseren aus der Republik Südafrika konnten keine Antikörper mit dem IFAT nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Ergebnisse der Untersuchung von 427 Schafseren aus Kenya auf Antikörper gegen NSDV im IFAT (reziproke Titer)

Herkunft der Seren	Anzahl der Seren	Anzahl der Seren mit dem IFAT-Antikörpertiter					Anzahl (%) der	
		<32	32	64	128	256	pos. Seren	neg. Seren
Isiolo	20	11	3	6			9 (45,0%)	11 (55,0%)
Naivasha	220	36	86	76	18	4	184 (83,6%)	36 (16,4%)
Moio	187	151	31	5			36 (19,3%)	151 (80,7%)
insgesamt:	427	198	120	87	18	4	229 (53,6%)	198 (46,4%)

4.3.1.1.6. Humanseren

Eines der Seren (K.M.) zeigte einen IFAT-Titer von 1:16. Die anderen Seren reagierten in der Verdünnungsstufe 1:8 negativ.

4.3.1.2. Antigennachweis

Nichtinfiziertes SMG, das im ersten Reaktionsschritt mit Antiserum überschichtet wurde, zeigt ebenso wie infiziertes SMG mit Normalserum von Schaf 2 ein völliges Ausbleiben von Fluoreszenz. Dagegen bewirkte das Antiserum des Schafes 2 vom 33. Tag p.i. in NSDV-haltigem SMG eine Immunofluoreszenz, deren Aussehen demjenigen in infizierten BHK-Zellen entsprach. Diese spezifische Fluoreszenz war besonders im subependymalen Gewebe, um den Arachnoidalraum und in den seitlichen Ventrikelsystemen lokalisiert. Daneben fluoreszierten auch einzelne Neurone und Gruppen von Nervenzellen der Großhirnrinde.

4.3.2. IHA

4.3.2.1. Kontrollreaktionen

Normalseren von Kaninchen und Schafen agglutinierten die NSDV-sensibilisierten Erythrozyten höchstens bis zur Verdünnungsstufe 1:16. Da jedoch manche Antiseren mit normalantigensensibilisierten Erythrozyten noch bis 1:32 eine unspezifische Hämagglutination zeigten, betrachteten wir in der IHA Titer von $\geq 1:64$ als spezifisch.

Eine Auswertung der Testplatten erfolgte nur dann, wenn die virusantigen- und nichtsensibilisierten Erythrozyten in Serumverdünnungsmittel einwandfrei knopfförmig sedimentierten, das heißt keine netzförmige Hämagglutination zu erkennen war. Die Ablesung des Titers wurde außerdem nur dann vorgenommen, wenn nichtsensibilisierte Erythrozyten in der Serumverdünnungsstufe 1:8 nicht agglutiniert waren.

Die Spezifität der Reaktionen konnte schließlich mit dem IHA-Hemmungstest deutlich demonstriert werden: Titer von Antiseren, die vor Zugabe der virussensibilisierten Erythrozyten mit einer NSD-Virussuspension gemischt wurden, lagen um mindestens 4 Verdünnungsstufen unter denjenigen unbehandelten Seren.

4.3.2.2. Immunseren von Kaninchen

3 Wochen p.i. war ein IHA-Titer von 1:512 (Kaninchen I und III) bzw. 1:256 (Kaninchen II) nachweisbar, der in der 5. Woche p.i. bei allen drei Tieren auf 1:1024 angestiegen war. In der 6. Woche p.i. ließen sich Werte von 1:512 (Kaninchen I und III) bzw. 1:256 (Kaninchen II) feststellen. Danach blieb der Antikörperspiegel bis zur zweiten Boosterung in der 36. Woche p.i. bzw. bei Kaninchen II bis zum Todeszeitpunkt konstant. Diese Boosterung hatte bei beiden Tieren einen Anstieg des IHA-Titers auf 1:4096 in der 37. Woche p.i. zur Folge. In der 45. Woche p.i. stellten wir noch einen IHA-Titer von 1:2048 fest.

4.3.2.3. Seren experimentell infizierter Schafe

Am 12. Tag p.i. trat bei Schaf 1 ein IHA-Titer von 1:128 auf. Dieser verringerte sich auf 1:64 am 14. Tag p.i. und stieg erst am 33. Tag p.i. wieder auf 1:128 an. Im Serum von Schaf 2 waren Antikörper in der IHA vom 12. bis 14. Tag p.i. in der Verdünnungsstufe 1:64 nachzuweisen. Der Titer erreichte am 18. Tag p.i. 1:128 und war in dieser Höhe auch am 33. Tag p.i. noch zu beobachten. Schaf 3 zeigte bereits am 7. Tag p.i. mit 1:64 einen spezifischen IHA-Titer. Nach einem vorübergehenden Anstieg auf 1:128 am 12. Tag p.i. war der gleiche Antikörpertiter auch vom 14. bis 26. Tag p.i. festzustellen.

4.3.2.4. Immunseren von Schafen aus Kenya

Die positiven Kontrollseren wiesen in der IHA Titer von 1:128 (Kontrollserum 1) bzw. 1:64 (Kontrollserum 2) auf.

4.3.2.5. Aus Afrika stammende Schafseren

In 238 (55,7%) der 427 untersuchten Schafseren aus Kenya waren NSDV-Antikörper mittels der IHA nachweisbar, während 189 Seren (44,3%) negativ beurteilt wurden. Der Antikörpertiter 1:64 wurde in 126 Seren, 1:128 in 78 Seren, 1:256 in 29 Seren sowie die Titerstufen 1:512 in 3 und 1:1024 in 2 Seren gefunden.

Der Anteil positiv beurteilter Seren war in jenen aus Naivasha mit 85,5% weitaus größer als in den Seren der Farm Lewa Down bei Isiolo (45,0%) und von Molo/Grassland (21,9%). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

In keinem der 50 Seren aus der Republik Südafrika konnten wir spezifische Antikörper gegen das NSDV in der IHA nachweisen.

4.3.2.6. Humanseren

Das Serum von K.M. wies einen IHA-Titer von 1:128 auf, während alle anderen Seren mit Titern von <1:16 negativ beurteilt wurden.

Tabelle 3: Ergebnisse der Untersuchung von 427 Schafseren aus Kenya auf Antikörper gegen NSDV in der IHA (reziproke Titer)

Herkunft der Seren	Anzahl der Seren	Anzahl der Seren mit dem IHA-Antikörpertiter						Anzahl (%) der	
		<64	64	128	256	512	1024	pos. Seren	neg. Seren
Isiolo	20	11	6	3				9 (45,0%)	11 (55,0%)
Naivasha	220	32	89	68	27	2	2	188 (85,5%)	32 (14,5%)
Molo	187	146	31	7	2	1		41 (21,9%)	146 (78,1%)
insgesamt:	427	189	126	78	29	3	2	238 (55,7%)	189 (44,3%)

4.3.3. ELISA (Angaben nach Meier, 1982)

4.3.3.1. Immunseren von Kaninchen

Der ELISA-Titer der Kaninchen stieg über 1:160 (Kaninchen I) bzw. 1:80 (Kaninchen II und III) in der 3. Woche p.i. auf Werte von 1:5120 (Kaninchen I) bzw. 1:2560 (Kaninchen II und III) in der 5. Woche p.i. (2 Wochen nach der ersten Boosterung) an. Von 1:640 in der 9. Woche p.i. sank der Antikörperspiegel in der 23. Woche p.i. auf 1:320 (Kaninchen I) und bei Kaninchen III nach der 23. Woche p.i. auf 1:160. Das letzte untersuchte Serum von Kaninchen II aus der 15. Woche p.i. wies einen ELISA-Titer von 1:320 auf. Eine Woche nach der zweiten Boosterung (37. Woche p.i.) erfolgte ein steiler Antikörperanstieg auf 1:5120. In der 45. Woche p.i. konnten Antikörper im ELISA noch bis zur Verdünnungsstufe 1:2560 festgestellt werden.

4.3.3.2. Seren experimentell infizierter Schafe

Im Serum von Schaf 1 war ein kontinuierlicher Anstieg des ELISA-Titers von 1:20 am 14. Tag p.i. auf 1:160 am 33. Tag p.i. zu beobachten. Ein positiver ELISA-Titer von 1:40 war bei Schaf 2 erstmals am 18. Tag p.i. nachweisbar. In der Folgezeit erhöhte sich der Antikörperspiegel über 1:80 am 26. Tag p.i. auf 1:160 am 33. Tag p.i.. Schaf 3 reagierte mit 1:20 am 18. Tag p.i.. Am Ende des Beobachtungszeitraumes am 26. Tag p.i. zeigte sich ein Titer von 1:40.

4.3.3.3. Immunseren von Schafen aus Kenya

In den positiven Schafseren aus Kenya waren mit dem ELISA NSDV-Antikörper bis zur Verdünnungsstufe 1:160 (Kontrollserum 1) bzw. 1:80 (Kontrollserum 2) demonstrierbar.

4.3.3.4. Aus Afrika stammende Schafseren

Mit dem ELISA wurden 298 (69,8%) der 427 Schafseren aus Kenya als positiv (Titer $\geq 1:80$) und 67 Seren (15,7%) negativ ($< 1:40$) beurteilt. 62 Seren (14,5%) mit einem ELISA-Titer von 1:40 wurden als "fraglich" eingestuft. Die Titerstufen der positiven Seren reichten von 1:80 (80 Seren) bis 1:2560 (2 Seren). Mit dem ELISA wurden in den aus Naivasha stammenden Schafseren

mehr antikörperhaltige Seren (95,4%) und höhere Titerstufen gefunden als in Seren von der Farm Lewa Down bei Isiolo (55,0%) und in Seren von Molo/Grassland (41,2%).

Eine zusammenfassende Darstellung der ELISA-Ergebnisse gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchung von 427 Schafseren aus Kenya auf Antikörper gegen NSDV im ELISA (reziproke Titer)

Herkunft der Seren	Anzahl der Seren	Anzahl der Seren mit dem ELISA-Antikörpertiter								Anzahl (%) der		
		<4o	4o	8o	16o	32o	64o	128o	256o	pos. Seren	fragl. Seren	neg. Seren
Isiolo	20	4	5	8	3					11 (55,0%)	5 (25,0%)	4 (20,0%)
Naivasha	220	5	5	30	74	62	27	15	2	210 (95,4%)	5 (2,3%)	5 (2,3%)
Molo	187	58	52	42	21	8	4	2		77 (41,2%)	52 (27,8%)	58 (31,0%)
insgesamt: 427		67	62	80	98	70	31	17	2	298 (69,8%)	62 (14,5%)	67 (15,7%)

Von den 50 Seren aus der Republik Südafrika trat bei 3 Seren ein fraglich positiver ELISA-Titer von 1:40 auf; die anderen 47 Seren wurden negativ eingestuft.

4.3.3.5. Humanserren

Eines der Seren (K.M.) reagierte im ELISA visuell und photometrisch um eine Stufe höher (1:80) als die anderen Seren und wurde als schwach positiv angesehen.

4.3.4. Vergleichende Beurteilung der serologischen Untersuchungs- methoden

4.3.4.1. Immunseren von Kaninchen

3 Wochen p.i. lagen in Seren mit NSDV immunisierter Kaninchen die IHA-Titer um 2 Verdünnungsstufen über denjenigen des IFAT und des ELISA. Dagegen wurden in der 5. Woche p.i. (2 Wochen nach der ersten Boosterung) mit dem ELISA die höchsten Titer erzielt, während IHA und IFAT um eine bis 2 Stufen niedriger reagierten. Bereits eine Woche später war ein Abfall des Antikörperspiegels mit allen Verfahren um mindestens eine Stufe zu beobachten. Danach blieben die IHA-Titer bis zur 35. Woche p.i. konstant. Im Gegensatz dazu sanken die IFAT-Titer allmählich auf 1: 128 und die ELISA-Titer auf 1:320 bzw. 1:160 ab. Auf die zweite Boosterung in der 36. Woche p.i. stieg der Antikörpergehalt der Seren erneut stark an, nämlich um 3 Titerstufen in der IHA und im IFAT sowie um 4 bis 5 Stufen im ELISA.

Der Antikörperverlauf von Kaninchen I ist beispielhaft in Abbildung 1 wiedergegeben.

Unsere Untersuchungen lassen darauf schließen, daß die mit der IHA gemessenen Antikörper zunächst schneller ansteigen als die mit den anderen Methoden erfassten Antikörper. Auf beide Boosterungen reagierte jedoch der ELISA mit dem höchsten Titeranstieg am empfindlichsten. Die maximal erzielten Titer in der 37. Woche p.i. betrugen 1:5120 im ELISA, 1:4096 in der IHA und 1:1024 im IFAT.

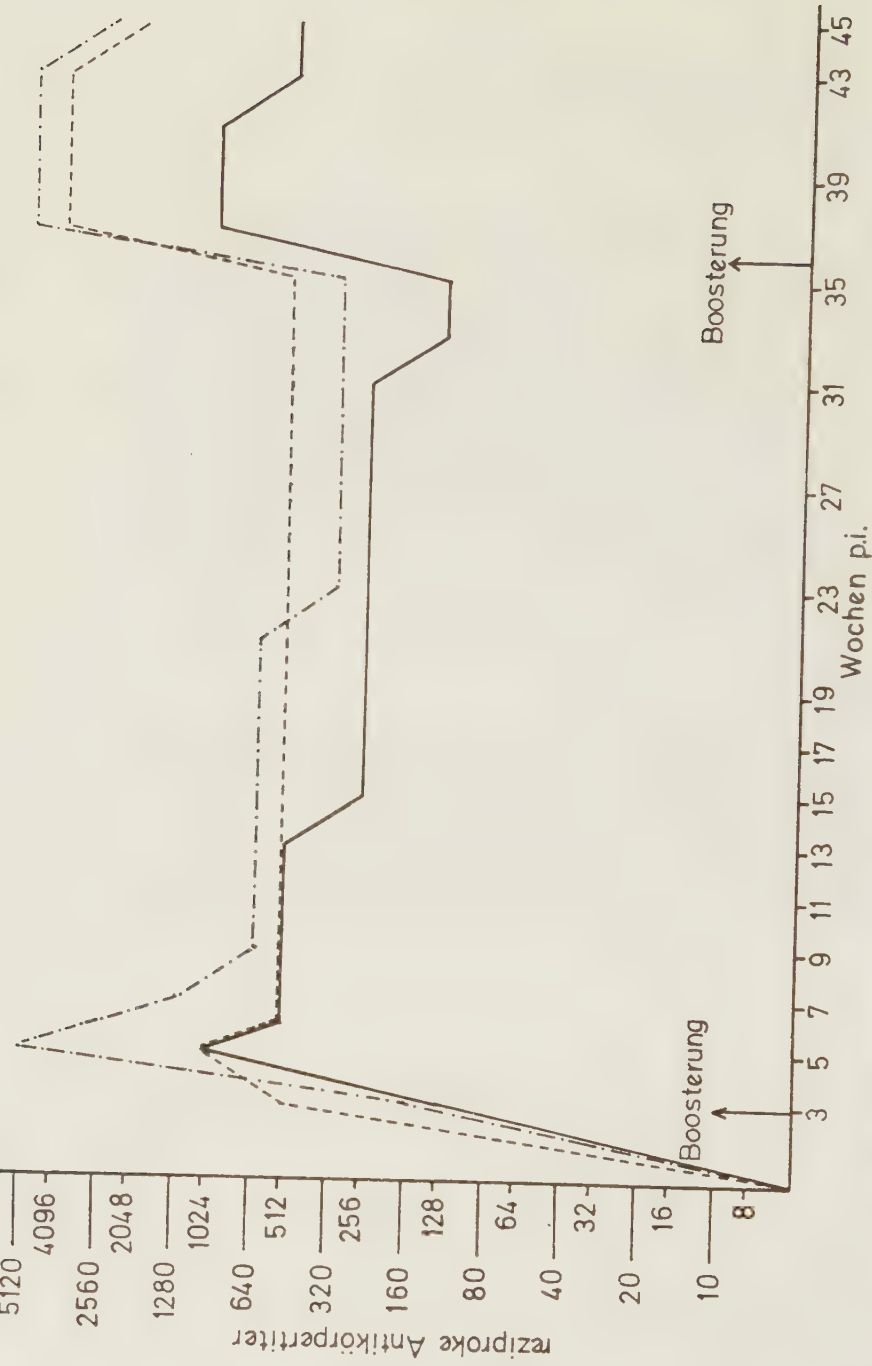


Abbildung 1: Antikörperverlauf im IFAT —, in der IHA --- bzw. im ELISA bei Kaninchen I nach Immunisierung mit NSDV

4.3.4.2. Seren experimentell infizierter Schafe

Die Abbildungen 2 bis 4 zeigen den Titerverlauf der 3 experimentell mit NSVD infizierten Schafe. Mit der IHA und dem IFAT waren am 12. Tag p.i. im Serum aller Tiere spezifische Antikörper demonstrierbar. Die IHA reagierte bei Schaf 3 bereits am 7. Tag p.i. positiv. Der ELISA ergab dagegen erst am 14. Tag p.i. (Schaf 1) bzw. 18. Tag p.i. positive Titer. Die höchsten IHA-Titer traten 2 bis 8 Tage vor denjenigen des IFAT auf, während der ELISA-Titer stets erst am Ende des Beobachtungszeitraumes von 26 (Schaf 3) bzw. 33 Tagen p.i. den Maximalwert erreichte. Dieser lag bei Schaf 3 am 26. Tag p.i. mit 1:40 noch um eine Verdünnungsstufe unter denjenigen der beiden anderen Verfahren (1:64), bei den Schafen 1 und 2 jedoch genauso hoch (1:160 gegenüber 1:128).

Dies entspricht den mit Kaninchenimmunsereen gewonnenen Erfahrungen. Aufgrund des Titerverlaufs kann angenommen werden, daß zumindest die ELISA-Titer bei einem längeren Beobachtungszeitraum noch höhere Werte erreicht hätten. Besonders auffällig war jedoch, daß die mit dem ELISA erfassten Antikörper 2 bis 11 Tage später auftraten als die mit IFAT und IHA gemessenen.

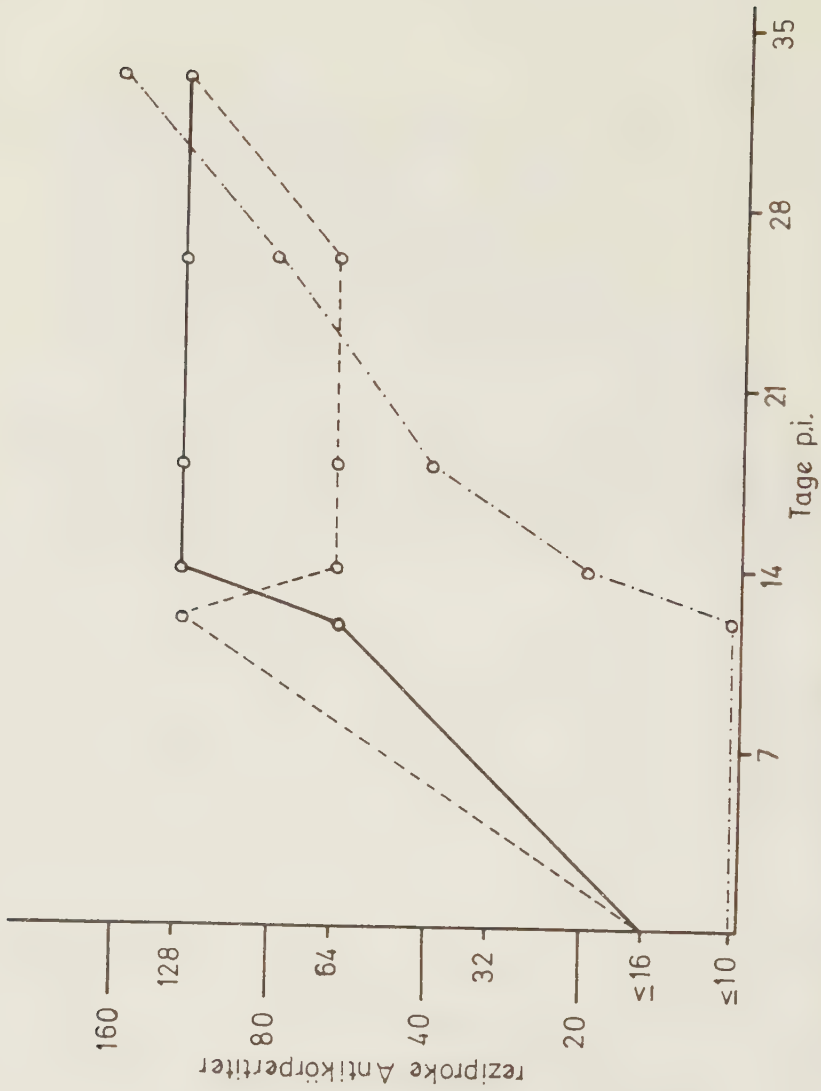


Abbildung 2: Antikörperverlauf im IFAT —, in der IHA --- bzw. im ELISA -.-.- bei Schaf 1 nach experimenteller NSDV-Infektion

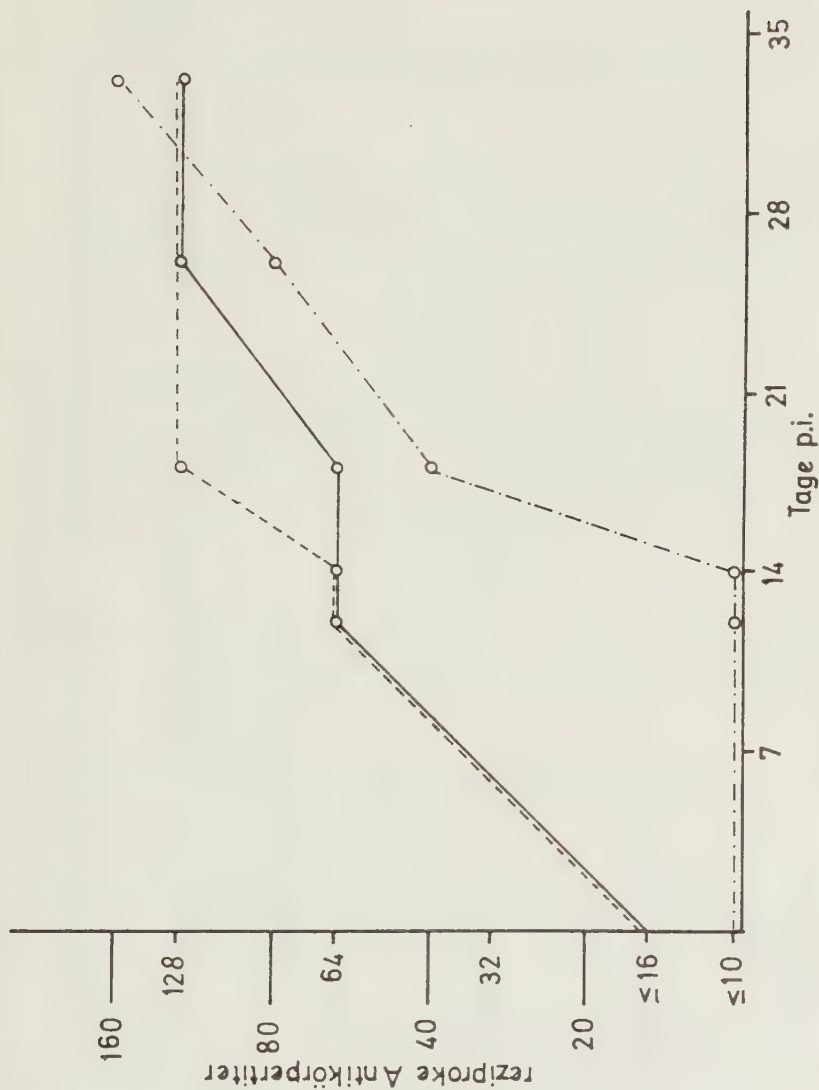


Abbildung 3: Antikörperverlauf im IFAT —, in der IHA - - bzw. im ELISA - - - - bei Schaf 2 nach experimenteller NSDV-Infektion

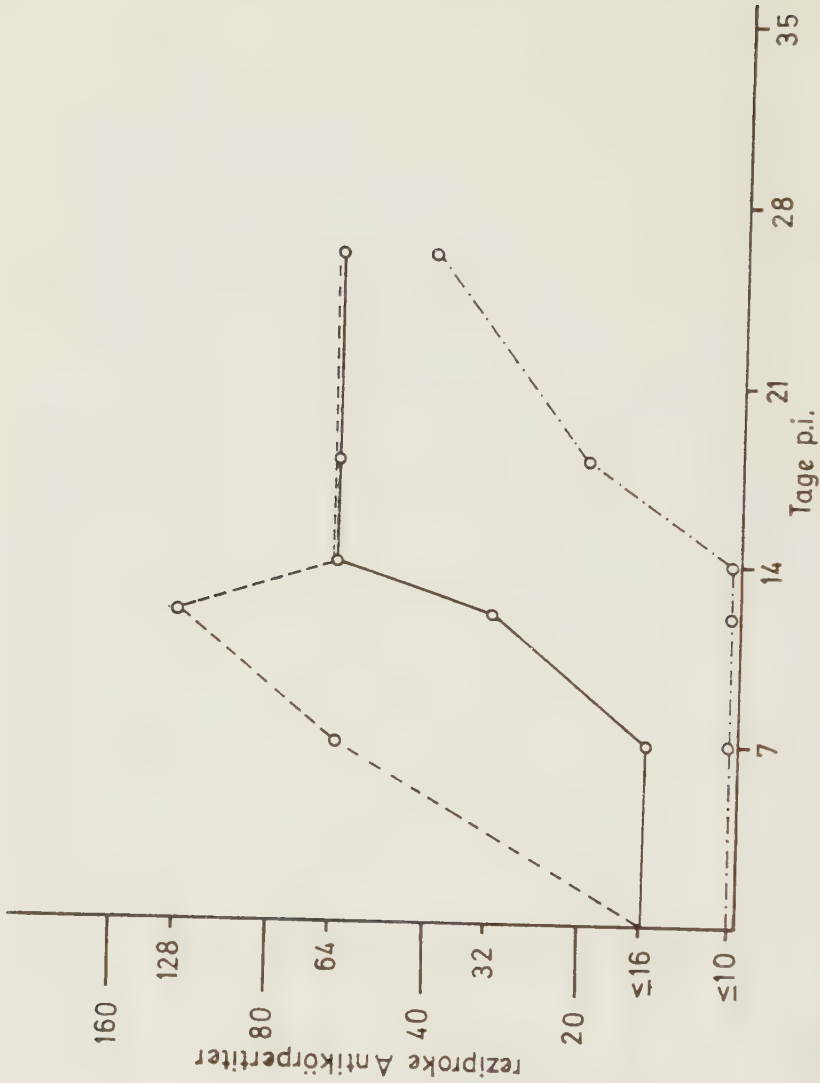


Abbildung 4: Antikörpervverlauf im IFAT —, in der IHA - - - bzw. im ELISA - - - -
bei Schaf 3 nach experimenteller NSDV-Infektion

4.3.4.3. Aus Afrika stammende Schafseren

Tabelle 5 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse, die mit den drei serologischen Methoden in 427 Schafseren aus Kenya erzielt wurden.

217 Seren (50,8%) waren übereinstimmend in allen drei Tests als positiv und 67 Seren (15,7%) als negativ zu beurteilen. 21 Seren (4,9%) reagierten bei negativen IFAT-Ergebnissen nur im ELISA und in der IHA positiv, während 12 Seren (2,8%) Antikörper nur im ELISA und im IFAT aufwiesen. Schließlich ergab der ELISA in 48 Seren (11,3%) durch die beiden anderen Verfahren nicht bestätigte positive und in 62 Seren (14,5%) fragliche Befunde.

Die Übereinstimmung in der Beurteilung eines Serums als "positiv" bzw. "negativ" betrug bei Zugrundelegung der Ergebnisse aller drei Methoden 66,5%. Bei einer Einstufung des als fraglich beurteilten ELISA-Titers von 1:40 als negativ würde sich diese Übereinstimmung auf 81,0% erhöhen, da dann weitere 62 Seren (14,5%) gleichlautend als negativ zu bezeichnen wären.

Tabelle 5: Vergleich der Ergebnisse der IHA, des IFAT und des ELISA beim Nachweis von NSDV-Antikörpern in 427 Schafseren aus Kenya

Beurteilung in			Anzahl (%) der Seren
ELISA	IHA	IFAT	
+	+	+	217 (50,8%)
+	+	-	21 (4,9%)
+	-	+	12 (2,8%)
+	-	-	48 (11,3%)
-	-	-	67 (15,7%)
fraglich	-	-	62 (14,5%)
insgesamt:			427 (100%)

+ NSDV-Antikörper nachgewiesen, - nicht nachgewiesen

fraglich: ELISA-Titer 1:40

Die beste Korrelation der Ergebnisse bestand mit einer übereinstimmenden Beurteilung von 394 Seren (92,3%) zwischen der IHA und dem IFAT. Nur in 33 Seren (7,7%) wurden mit diesen beiden Tests divergierende Ergebnisse erzielt. Dabei waren 21 Seren (4,9%) nur in der IHA und 12 Seren (2,8%) nur im IFAT positiv. Mit diesen beiden Methoden fanden wir auch eine weitgehende Übereinstimmung der Titerhöhen. Die IHA-Titer waren überwiegend gleich hoch oder um eine Stufe höher als die entsprechenden IFAT-Titer.

Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen ELISA und IHA fanden wir in 305 Seren (71,4%). Von den 122 verbleibenden Seren (28,6%) enthielten 60 (14,1%) nur im ELISA nachweisbare Antikörper; 62 Seren (14,5%) wiesen den fraglichen ELISA-Titer 1:40 auf.

Die Beurteilungen von ELISA und IFAT korrelierten am geringsten miteinander, nämlich nur in 296 Seren (69,3%). Hier ergab der ELISA bei gleichzeitig negativen IFAT-Ergebnissen in 69 Seren (16,2%) positive und in 62 Seren (14,5%) fragliche Einstufungen. Mit dem ELISA ließen sich in allen Seren NSDV-Antikörper nachweisen, die auch mit der IHA oder dem IFAT als positiv eingestuft worden waren; die relative Sensibilität des ELISA (die Fähigkeit zur Bestätigung einer positiven Beurteilung durch die beiden anderen Tests) betrug also 100,0%. Die im ELISA erzielten Titer lagen in keinem Serum unter denjenigen des IFAT und nur in 7 Seren unter den IHA-Titern.

Die Korrelation der in den drei Verfahren gefundenen Titer - beispielhaft für 220 Seren aus Naivasha - geht aus den Tabellen 6 bis 8 hervor.

Tabelle 6: Vergleich der NSDV-Antikörpertiter von 22o Schafseren aus Naivasha im IFAT und in der IHA (reziproke Werte)

IFAT-Titer	Anzahl der Seren mit IHA-Titern von					
	<64	64	128	256	512	1o24
<32	23	12	.	1		
32	6	48	3o	2		
64	3	26	31	16		
128		3	6	6	2	1
256			1	2		1

Tabelle 7: Vergleich der NSDV-Antikörpertiter von 22o Schafseren aus Naivasha im IFAT und im ELISA (reziproke Werte)

IFAT-Titer	Anzahl der Seren mit ELISA-Titern von							
	<4o	4o	8o	16o	32o	64o	128o	256o
<32	5	5	11	12	3			
32			13	36	28	7	2	
64			6	25	25	14	6	
128				1	5	6	5	1
256					1		2	1

Tabelle 8: Vergleich der NSDV-Antikörpertiter von 22o Schafseren aus Naivasha in der IHA und im ELISA

IHA-Titer	Anzahl der Seren mit ELISA-Titern von							
	<4o	4o	8o	16o	32o	64o	128o	256o
< 64	5	5	8	8	6			
64			19	39	16	12	3	
128			2	26	25	9	5	1
256			1	1	15	5	4	1
512						1	1	
1o24							2	

Der Antikörpergehalt derjenigen Seren, in denen nur mit einem oder zwei Verfahren Antikörper nachweisbar waren, lag immer an der unteren Sensibilitätsgrenze; solche Seren waren im ELISA und in der IHA höchstens 3 Stufen (1:320 im Elisa bzw. 1:256 in der IHA) sowie im IFAT maximal 2 Stufen (1:64) positiv.

Mit allen drei Verfahren wurden in Seren aus Naivasha mehr positive Ergebnisse und höhere NSDV-Antikörpertiter gefunden als in Seren von der Farm Lewa Down bei Isiolo und von Molo/Grassland. Aus letzterer Gegend stammten auch die meisten divergierend beurteilten Seren. Der niedrigste ELISA-positive Titer 1:80 trat hier am häufigsten auf und 52 der insgesamt 62 Seren, die mit einem ELISA-Titer von 1:40 fraglich eingestuft wurden, kamen aus Molo/Grassland.

Die Immunsere von Schafen aus Kenya wiesen in den drei Verfahren nur niedrige Antikörpertiter von 1:64 im IFAT, 1:128 (Kontrollserum 1) bzw. 1:64 (Kontrollserum 2) in der IHA und 1:160 bzw. 1:80 im ELISA auf.

Von den 50 Schafseren aus der Republik Südafrika fielen 47 übereinstimmend negativ aus. 3 Seren wiesen den fraglichen ELISA-Titer 1:40 auf, wobei Antikörper mit den beiden anderen Methoden nicht nachweisbar waren.

4.3.4.4. Humanseren

Von den untersuchten Seren der Institutsmitarbeiter zeigte nur das Serum von K.M. in allen 3 Verfahren eine - unterschiedlich starke - positive Reaktion. Fluoreszenzserologisch waren in diesem Serum NSDV-Antikörper bis zur Verdünnungsstufe 1:16 nachweisbar. Dieser Titer liegt um mindestens 2 Stufen über denjenigen der anderen Humanseren, die in der Verdünnung 1:8 keine Fluoreszenz zeigten. Der IHA-Titer dieses Serums von 1:128 entspricht einem positiven Ergebnis von mindestens 4 Stufen, da alle übrigen Seren Titer von $\leq 1:16$ aufwiesen. Im ELISA schließlich war mit diesem Serum nur eine schwach positive Reaktion von 1:80, die um eine Stufe höher ausfiel als in den anderen Humanseren, zu beobachten.

5. DISKUSSION

Eine synoptische Betrachtung und kritische Beurteilung der bisher zum Nachweis spezifischer Nairobi Sheep Disease-Virus(NSDV)-Antikörper verwendeten Methoden läßt folgendes erkennen:

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) ist nach TERPSTRA (1969) aufgrund der kurzen Nachweisbarkeit komplementbindender Antikörper für epidemiologische Erhebungen nicht brauchbar. Dies wird durch DAVIES, JESSETT und OTIENO (1976) bestätigt. Nach experimenteller Infektion von Schafen waren in der KBR 15 Monate post infectionem (p.i.) bereits 3 von 7 Seren negativ, während mit der indirekten Hämagglutination (IHA) und dem indirekten Immunofluoreszenzantikörpertest (IFAT) noch positive Ergebnisse erzielt wurden. Als weitere Nachteile der KBR werden ihre geringe Sensibilität und größere technische Probleme bei der Durchführung angesehen.

Der Serumneutralisationstest (SNT) scheint als Routinemethode zum NSDV-Antikörpernachweis ebenfalls nicht in Frage zu kommen. TERPSTRA (1969) fand neben einer relativ niedrigen Empfindlichkeit dieses Tests, die auch DAVIES (1978) beschrieb, eine Abhängigkeit der Ergebnisse von den verwendeten Zellkulturen. DAVIES, JESSETT und OTIENO (1976) konnten nur einen Monat nach der Infektion von Schafen einen höheren Neutralisationstiter beobachten als vor der Infektion, sodaß der SNT zum Antikörpernachweis als nicht brauchbar bezeichnet wurde.

Die Agargelpräzipitation (AGP) zeichnet sich nach TERPSTRA (1969) zwar durch eine schnelle und einfache Durchführbarkeit aus, besitzt jedoch eine geringe Sensibilität. Die Titer von Mäusehyperimmunseren waren 10 bis 80fach niedriger als entsprechende KBR-Titer. DAVIES, MUNGAI und TAYLOR (1977) konnten sogar in Rekonvaleszentenseren an Nairobi Sheep Disease (NSD) erkrankter Schafe keine präzipitierenden Antikörper nachweisen.

Seit wenigen Jahren werden der IFAT und die IHA als geeignete Verfahren angesehen. Sie zeichnen sich angeblich beide durch eine hohe Sensibilität aus. So fanden DAVIES, JESSETT und OTIENO (1976) nach experimenteller Infektion und DAVIES (1978) bei Untersuchungen einer größeren Anzahl von

Schafseren IFAT-Titer bis 1:10240. Mit der IHA waren Antikörper sogar in noch höheren Serumverdünnungsstufen nachweisbar: IHA-Titer von 1:20480 beschrieben DAVIES, JESSETT und OTIENO (1976) einen Monat nach der Infektion von Schafen und solche bis 1:40960 JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976) sowie JESSETT (1978) in epidemiologischen Studien über die Verbreitung der NSD. Derartige Titerhöhen sind ungewöhnlich. Sie fanden bisher keine Bestätigung in der Literatur.

Auch nach Verabreichung von NSD-Vakzinen konnten mit beiden Verfahren Antikörper in Schafseren demonstriert werden (DAVIES, OTIENO und JESSETT, 1977). Die Autoren halten die IHA und den IFAT auch wegen ihrer relativ einfachen Durchführbarkeit für geeignet zu größeren serologischen Reihenuntersuchungen.

Mit dieser Arbeit sollten diese Aussagen zur Sensitivität und Praktikabilität des IFAT und der IHA überprüft und ihre Anwendbarkeit für seroepidemiologische Untersuchungen verbessert werden. Dazu war es notwendig, die Tests gegenüber den Angaben anderer Autoren in wichtigen Details zu modifizieren.

Zunächst führten wir den IFAT ebenfalls nach der sogenannten Deckglasmethode durch. Dabei werden die Zellen auf Deckgläschen in Leighton-Röhrchen angezüchtet. Nach der Virusvermehrung entnimmt man die Deckglaskulturen, fixiert sie und benutzt sie zur Durchführung der Fluoreszenzfärbung. Wir änderten dann dieses Verfahren wesentlich, indem wir erstmals die sogenannte Suspensionsmethode zum Nachweis von NSDV-Antikörpern erprobten. Die in Kunststoffgefäßen dichtgewachsenen, virusinfizierten Zellen werden suspendiert, auf Objektträger gebracht und fixiert. Dieses Verfahren stellte sich gegenüber der Deckglasmethode als sehr vorteilhaft heraus, da der Arbeitsgang der Zellanzüchtung und Virusinfizierung in Leighton-Röhrchen entfällt. Auch ist es wesentlich einfacher und materialsparender, da in der Deckglasmethode pro Deckgläschen nur eine Serumprobe bzw. -verdünnungsstufe, auf den von uns verwendeten gefelderten Objektträgern dagegen 12 Proben bzw. Verdünnungen geprüft werden können. Hierdurch erleichtert und verkürzt sich auch der Mikroskopiervorgang erheblich, was besonders für serologische Reihenuntersuchungen von Bedeutung ist. Obwohl für die Auswertung der Fluores-

zenz kein intakter Zellrasen mehr zur Verfügung steht, wird die Beurteilung nach unseren Erfahrungen bei der Suspensionsmethode nicht durch Zelltrümmer gestört. Durch die von uns gewählte Aufnahme der Zellen eines 175 cm^2 -Gefäßes in 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) war immer eine ausreichende Anzahl morphologisch intakter Zellen pro Gesichtsfeld garantiert. Eine sorgfältige Suspendierung der Zellen vor dem Aufbringen auf die Objektträger muß jedoch beachtet werden.

Nach den Angaben von JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976) werden für die Antigensensibilisierung in der IHA jeweils frische Schaferythrozyten verwendet. Wir benutzten erstmals stabilisierte Erythrozyten zur Kopplung des NSDV-Antigen. Gegenüber frischen, nicht stabilisierten Erythrozyten, die nur wenige Tage haltbar sind, hat dies den großen Vorteil, daß während der laufenden Tests nicht ständig ein Schaf als Erythrozytenspender gehalten werden muß. So genügte für unsere Untersuchungen die einmalige Abnahme einer größeren Menge Schafblut, aus dem anschließend die Erythrozyten gewonnen und mit Glutaraldehyd stabilisiert wurden. So behandelte Erythrozyten konnten mehrere Wochen aufbewahrt werden. Gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert trat sogar über mindestens 9 Monate hinweg keine Einschränkung der Verwendbarkeit der stabilisierten Erythrozyten auf.

Bei der Antigengewinnung für die IHA erwies es sich als notwendig, das Virusantigen mittels Ultraschallbehandlung aus den infizierten Zellen freizusetzen, da die von uns benutzten NSD-Virusstämme keinen ausreichenden lytischen zytopathischen Effekt (cpE) entwickelten. Die optimale Tanninkonzentration und Antigenverdünnung zur Virussensibilisierung der Erythrozyten ermittelten wir durch Titrationsen.

Mit entsprechenden Kontrollfärbungen bzw. -reaktionen gelang es uns, die Spezifität der erhaltenen serologischen Ergebnisse nachzuweisen. Antikörpertiter von $\geq 1:32$ im IFAT bzw. $\geq 1:64$ in der IHA konnten als positiv angesehen werden. Einen zusätzlichen Spezifitätsnachweis, wie er für diese beiden Methoden in der NSD-Serologie bisher nicht eingesetzt worden war, stellt der sogenannte Hemmungstest dar. Nach Mischung von Antiseren mit einer NSD-Virussuspension konnten wir ein Absinken der IFAT-Titer um

mindestens 2 bzw. der IHA-Titer um mindestens 4 Verdünnungsstufen feststellen. BLUE, DAWE und GRATZEK (1974) beobachteten beim Antikörperrnachweis gegen das Bluetongue-Virus mit dieser Spezifitätskontrolle einen Abfall des IHA-Titers um mindestens 8 Stufen.

Der Antikörpergehalt im Serum von Schaf 2 vom 33. Tag p.i. ließ sich auch durch den Nachweis von Immunofluoreszenz in Gefrierschnitten der Gehirne intracerebral (i.c.) infizierter Saugmäuse demonstrieren. Die Lokalisation der fluoreszierenden Zellen scheint auf eine Ausbreitung des Virus im Arachnoidalraum hinzudeuten. DAVIES, MUNGAI und TAYLOR (1977) beschrieben einzelne und Gruppen von antigenhaltigen Nervenzellen im Groß- und Kleinhirn i.c. mit NSDV infizierter Mäuse.

Eine Analyse der Ergebnisse läßt erkennen, daß mit unseren Testsystemen nur relativ niedrige Antikörpertiter nachgewiesen wurden. In den Seren experimentell infizierter Schafe gingen die Titer in beiden Verfahren nicht über 1:128 hinaus. Die Schafseren aus Kenya reagierten höchstens bis 1:256 im IFAT bzw. 1:1024 in der IHA positiv. Auch in den NSD-Immunseren aus Kenya, die wir als Positivkontrollen untersuchten, waren Antikörper nur bis zu den Verdünnungsstufen 1:64 im IFAT bzw. 1:128 in der IHA feststellbar. Aus den Publikationen über den Nachweis von NSDV-Antikörpern sind jedoch IFAT-Titer bis 1:10240 (DAVIES, JESSETT und OTIENO, 1976; DAVIES, 1978) und IHA-Titer bis 1:40960 (JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU, 1976) bekannt. Die höhere Sensibilität der IHA ging jedoch anscheinend mit höheren unspezifischen Reaktionen einher, da JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976) nur Titer von $\geq 1:80$ bzw. JESSETT (1978) $\geq 1:160$ als positive Reaktion werteten. Andererseits weiß man, daß die Verwendung stabilisierter anstelle von frischen Erythrozyten die Sensibilität der IHA etwas herabsetzt (siehe bei MAYR und Mitarb., 1977); wir halten es aber für wenig wahrscheinlich, daß die unterschiedlich hohen Titerwerte dadurch erklärbar sind.

Bei den von uns infizierten Merinolandschafen beobachteten wir in Übereinstimmung mit MUNDERLOH (1977) trotz einer hohen Virämie insgesamt nur gering ausgeprägte klinische Symptome. TERPSTRA (1969) beschrieb, daß europäische Schafrassen weniger schwer an NSD erkranken und eine höhere Überlebensrate aufweisen als in Afrika heimische. DAVIES, MUNGAI und SHAW (1974) bemerkten ebenfalls eine unterschiedliche Resistenz verschiedener

Schafressen. Die Autoren machten deshalb darauf aufmerksam, daß eine Virulenzabschwächung des NSDV nur gemessen werden kann, wenn man zur Kontrolle die im Versuch verwendete Schafrasse benutzt. Die geringere Empfindlichkeit der hiesigen Schafe für das NSDV könnte auch in einer niedrigeren Antikörperbildung zum Ausdruck kommen. Denkbar ist ebenfalls, daß der Beobachtungszeitraum von 26 (Schaf 3) bzw. 33 Tagen p.i. zu kurz war, um das Maximum des Antikörperspiegels zu erfassen.

Leider war es uns nicht möglich, näheres über den Infektionszeitpunkt und -verlauf der Schafe aus Kenya zu erfahren, deren Seren uns als positive Kontrolle dienten. So können wir keine Aussage über die Bedeutung der in diesen beiden Seren gemessenen Antikörpertiter machen.

Hinsichtlich der anderen aus Kenya stammenden Schafseren erscheint uns als Ursache für die niedrigen Titer eine mangelhafte Serumqualität am wahrscheinlichsten. Viele Seren waren hämolytisch oder - offensichtlich infolge mikrobieller Verunreinigung - grobsinnlich erkennbar verändert. Uns ist nicht bekannt, welchen Bedingungen diese Seren bis zur Untersuchung unterworfen waren. Eine Zentrifugation bei 2200 g über 10 Minuten blieb auf die Serumqualität ohne sichtbaren Einfluß. Nach PRAGER und WITTE (1981) wirken sich bereits Temperaturen über 4°C nachteilig auf die im IFAT nachweisbaren Antikörpertiter aus.

Trotzdem läßt sich, vergleicht man die im IFAT und in der IHA erzielten Ergebnisse miteinander, in allen Gruppen der untersuchten Seren eine weitgehende Übereinstimmung feststellen. Bei der Beurteilung der 427 Schafseren aus Kenya wurden lediglich in 33 Seren (7,7%) divergierende Ergebnisse gefunden. In 21 Seren (4,9%) waren nur mit der IHA und in 12 Seren (2,8%) nur mit dem IFAT NSDV-Antikörper nachweisbar. Die Titer dieser unterschiedlich eingestuftten Seren lagen immer an der unteren Sensibilitätsgrenze und betrugen höchstens 1:64 im IFAT und 1:128 - nur in einem Serum 1:256 - in der IHA. In 394 Seren (92,3%) erzielten wir dagegen Übereinstimmung, wobei 217 Seren (50,8%) positiv und 177 Seren (41,5%) negativ beurteilt wurden. Die IHA-Titer waren überwiegend genauso hoch oder um eine Stufe höher als die entsprechenden IFAT-Titer. Wir fanden spezifische Antikörper fluoreszenzserologisch bis zur Verdünnungsstufe 1:256 bzw. in der IHA bis 1:1024.

Auffällig war die unterschiedliche Anzahl positiv beurteilter Seren aus den verschiedenen Gebieten Kenyas und deren Antikörperverteilung. Mit beiden Verfahren konnten in Seren von Naivasha weitaus mehr antikörperhaltige Seren (83,6% im IFAT bzw. 85,5% in der IHA) und höhere Titer gefunden werden als von der Farm Lewa Down in Isiolo (45,0% in beiden Tests). Der geringste Anteil positiver Seren war in Molo/Grassland (19,3% im IFAT bzw. 21,9% in der IHA) festzustellen.

Auch JESSETT, DAVIES und RWEYEMAMU (1976) fanden zwischen den Ergebnissen des in der Verdünnungsstufe 1:10 als Screening-Test durchgeführten IFAT und der IHA eine gute Übereinstimmung. Von 17 Schaf- und 26 Ziegenserum enthielten 6 Seren mit einem IHA-Titer von $\leq 1:80$ keine im IFAT nachweisbaren Antikörper. Die positiven IFAT-Beurteilungen der anderen Seren wurden in der IHA bestätigt, wobei 25 Seren Titer von 1:80 bis 1:2560 und 14 Seren sogar Werte von 1:5120 bis 1:40960 aufwiesen.

Im Gegensatz zu unseren Befunden bei den Schafserum in Kenya waren in denjenigen aus der Republik Südafrika mit beiden Methoden keine NSDV-Antikörper nachweisbar. Dieses Ergebnis bestätigt, daß das Krankheitsbild der NSD in der Republik Südafrika nicht bekannt ist; man darf annehmen, daß klinische Fälle von NSD beim Standard der dortigen Schafzucht sicher nicht unbemerkt geblieben wären.

Ein etwas unterschiedliches Verhalten der beiden Tests ergab sich bei der Antikörperentwicklung von experimentell infizierten Tieren. Die in der IHA gemessenen Antikörper lagen in Kaninchenimmenserum 3 Wochen p.i. um 2 Verdünnungsstufen über denjenigen des IFAT, während 2 Wochen nach der ersten Boosterung gleich hohe Titer zu beobachten waren. In Seren infizierter Schafe trat der höchste Titer in der IHA bereits 2 bis 8 Tage früher auf als im IFAT. Zudem reagierte Serum von Schaf 3 am 7. Tag p.i. erstmals positiv, während mit dem IFAT hier noch keine Antikörper feststellbar waren. Diese Unterschiede sind höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Immunglobulinklassen zurückzuführen, die mit diesen beiden Verfahren erfasst werden. Aufgrund des verwendeten Antischafglobulins konnte fluoreszenzserologisch nur Immunglobulin (Ig) G

nachgewiesen werden; in der IHA reagierte dagegen auch Ig M, das besonders im frühen Stadium einer Infektion gebildet wird.

Das Antikaninchenglobulin erfasst neben Ig G auch Ig M. Der schnellere Anstieg der IHA-Titer in Kaninchenserum beruht also nicht auf diesem Unterschied. Der Antikörperspiegel in diesem Verfahren blieb bis zur 2. Boosterung in der 36. Woche p.i. auf dem relativ hohen Niveau von 1:512 bestehen, während sich im IFAT ein geringer Titerabfall auf 1:128 zeigte. Auch danach lagen die IHA-Titer noch um 2 Stufen über denjenigen des IFAT. Über die Dauer der Nachweisbarkeit von NSDV-Antikörpern beim Schaf können wir jedoch wegen des kurzen Beobachtungszeitraumes keine Aussage machen. Nach DAVIES, JESSETT und OTIENO (1976) reagieren Seren von experimentell infizierten Schafen auch 15 Monate p.i. noch in beiden Tests positiv; damit scheint gewährleistet zu sein, daß auch längere Zeit zurückliegende Infektionen erfasst werden.

Vergleicht man den IFAT und die IHA hinsichtlich Zeitaufwand und Schwierigkeiten bei ihrer Durchführung, so sind folgende Arbeitsgänge zu berücksichtigen:

Im IFAT dienen die infizierten Zellen direkt als Antigen für die Durchführung des Testes, sodaß keine aufwendige Antigenaufbereitung notwendig ist. Nach der Zellzüchtung und Virusvermehrung in Kunststoffgefäßen müssen die Zellen suspendiert, auf Objektträger gebracht und fixiert werden. Die Antigengewinnung für die IHA ist dagegen arbeitsintensiver. Zuerst galt es, NSDV, das ebenfalls in Zellkulturen vermehrt wurde, mittels Ultraschallbehandlung aus den Zellen freizusetzen, dann durch eine Fällung mit Polyethylenglykol (PEG) anzureichern und schließlich zu dialysieren. Erst jetzt konnten Hammelerythrozyten mit diesem Antigen sensibilisiert werden. Virussensibilisierte Erythrozyten waren nur etwa 2 bis 3 Wochen lang bei 4°C haltbar, danach stellten sich Spontanagglutinationen ein und die Erythrozyten konnten nicht mehr für die IHA verwendet werden. Mit virusinfizierten Zellen beschichtete und acetonfixierte Objektträger für den IFAT können nach unseren Erfahrungen dagegen mehrere Monate bei -20°C ohne Verlust ihrer Antigenspezifität aufbewahrt werden.

Die eigentliche Testdurchführung dagegen ist in der IHA einfacher. Es sind nicht 2 Reaktionsschritte wie im IFAT (Serum- und Konjugatüberschichtung des Antigens) und auch keine Waschvorgänge notwendig. Die Ablesung des

Ergebnisse ist ebenfalls bei der IHA unkomplizierter, da sie mit bloßem Auge vorgenommen werden kann. Prinzipiell stehen die IHA-Ergebnisse schneller zur Verfügung: Eine Beurteilung der Hämagglutination in Mikrotiterplatten ist nach 2 Stunden bei Zimmertemperatur möglich; die Aufbewahrung der Platten über Nacht bei 4°C ergibt nach unseren Beobachtungen jedoch deutlichere Agglutinationsbilder.

Die mühsame Auswertung der Immunofluoreszenz mit dem Mikroskop stellt wohl den schwerwiegendsten Nachteil des IFAT dar, der auch am ehesten die Eignung dieses Verfahrens für größere Reihenuntersuchungen einschränkt. Durch die Verwendung der Suspensions- anstelle der Deckglasmethode und gefeldeter Objektträger kann dieser Arbeitsgang zwar erheblich verkürzt und erleichtert, jedoch nicht ersetzt werden. Der IFAT stellt damit auch größere Ansprüche an die Laborausstattung (Fluoreszenzmikroskop).

Bei der IHA wiederum fällt die Serumvorbehandlung negativ ins Gewicht. Jedes Serum muß vor dem Testansatz inaktiviert und zur Entfernung unspezifischer Antikörper mit Hammelerythrozyten absorbiert werden. So sind bereits vor dem eigentlichen Test für jedes Serum 3 Pipettievorgänge (Abnahme eines bestimmten Serumvolumens, Zugabe der Erythrozytensuspension, Absaugen des absorbierten Serums) erforderlich.

Insgesamt gesehen, empfinden wir die IHA als etwas einfacher und schneller durchführbar als den IFAT; auch aufgrund des geringeren Laboraufwandes erscheint uns die IHA für seroepidemiologische Untersuchungen vorteilhafter.

Aufgabe dieser Arbeit war es schließlich auch, die im IFAT und in der IHA erzielten Ergebnisse mit denjenigen zu vergleichen, die MEIER (1982) unter Verwendung gleicher Serumproben mit der indirekten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Technik ermittelt hatte.

In Kaninchenimmunsereen waren 3 Wochen p.i. im ELISA Antikörpertiter feststellbar, die etwa denjenigen des IFAT entsprachen. 5 Wochen p.i. (2 Wochen nach der ersten Boosterung) lagen dagegen die ELISA-Titer um eine bis 2 Verdünnungsstufen über den IFAT- und IHA-Titern. Nach einem Absinken des Antikörperspiegels bis zur 35. Woche p.i. reagierte der ELISA auf die zweite Boosterung mit einem Titeranstieg um 4 bis 5 Stufen erneut am empfindlichsten.

Bei der Untersuchung der Seren experimentell infizierter Schafe zeigte sich deutlich, daß die im ELISA gemessenen NSDV-Antikörper später nachweisbar werden als mit den anderen beiden Methoden. Während die IHA und der IFAT bereits am 7. bis 12. Tag p.i. positiv reagierten, erreichte der ELISA erst zwischen dem 14. und 18. Tag p.i. spezifische Werte. Auch der höchste Antikörpertiter war beim ELISA später als die Titergipfel im IFAT und in der IHA zu beobachten, nämlich jeweils am Ende des Beobachtungszeitraumes (26 bzw. 33 Tage p.i.). Daher ist wohl mit einiger Sicherheit anzunehmen, daß zumindest die ELISA-Titer noch höher angestiegen wären und damit die Titer der beiden anderen Verfahren übertroffen hätten.

Der gegenüber dem IFAT verzögerte Antikörperanstieg im ELISA kann nicht mit dem Nachweis unterschiedlicher Immunglobulinklassen der gemessenen Antikörper erklärt werden, da in beiden Verfahren mit den verwendeten Konjugaten nur Ig G erfasst wurde. Man hat gleichartige Beobachtungen auch bei anderen Virusinfektionen gemacht. So fanden NOON und Mitarb. (1980) Ig G-Antikörper gegen Staupevirus im ELISA erst in der 4. bis 5. Woche nach experimenteller Infektion von Hunden. Bei Verwendung eines Konjugates im ELISA, das nur Ig M-Antikörper erfasst, reagierte der ELISA dagegen bereits eine Woche p.i. positiv.

In 427 Schafseren aus Kenya war eine teilweise Divergenz der ELISA-Ergebnisse im Vergleich zu den beiden anderen Methoden festzustellen. Eine übereinstimmende Beurteilung mit der IHA fanden 305 Seren (71,4%) bzw. mit dem IFAT 296 Seren (69,3%). Zwischen IHA und IFAT korrelierten die Ergebnisse dagegen in 394 Seren (92,3%). Diese Unterschiede liegen darin begründet, daß niedrige ELISA-Titer oft nicht durch die anderen Verfahren bestätigt werden konnten. Alle 62 Seren (14,5%) mit ELISA-fraglicher Beurteilung waren in IHA und IFAT negativ. 60 Seren (14,1%) wiesen in der IHA und 69 Seren (16,2%) im IFAT keine nachweisbaren Antikörper auf, während mit dem ELISA niedrig positive Titer zwischen 1:80 und maximal 1:320 erzielt wurden. Als Ursache hierfür könnte eine eventuell längere Nachweisbarkeit der NSDV-Antikörper im ELISA in Betracht kommen. Leider liegen hierüber für die NSD noch keine Erfahrungen vor. Eine weitere Interpretation der Befunde ist nicht möglich, weil Angaben über den Immunstatus der Schafe fehlen.

Da bei Boosterungen von Kaninchen die ELISA-Titer am stärksten anstiegen, könnten natürliche Reinfektionen von Schafen einen ähnlichen Titerverlauf bewirken und dazu führen, daß NSDV-Antikörper mit dem ELISA länger feststellbar sind als mit IHA und IFAT.

Ein Teil der nur im ELISA positiv beurteilten Seren beruht sicherlich auf der höheren Sensibilität dieses Tests, dessen Titer immer mindestens so hoch waren wie diejenigen des IFAT und nur in 7 Seren unter denen der IHA lagen. Auch in den Immunsereen von Schafen aus Kenya, die als positive Kontrolle untersucht wurden, erzielte der ELISA mindestens ebenso hohe Antikörpertiter. Die hohe Sensibilität des ELISA zeigte sich auch darin, daß kein Serum bei ELISA-negativer Einstufung in einem der beiden anderen Verfahren positiv beurteilt wurde.

Einige ELISA-positive Ergebnisse könnten auf Kreuzreaktionen mit anderen Bunyaviren zurückzuführen sein. Auch DAVIES (1978) erklärte IHA-Titer in Wildtierseren bis 1:320, die in seinem Testsystem als niedrig positiv anzusehen waren, mit der Möglichkeit solcher Kreuzreaktionen.

Anscheinend spielt die Serumqualität für die Beurteilung im ELISA ebenfalls eine Rolle. HAMDY und Mitarb. (1981) beobachteten beim Antikörpernachweis gegen das Virus der Afrikanischen Schweinepest in hämolytischen und mikrobiell verunreinigten Seren unspezifische Reaktionen, die zu falsch positiven Beurteilungen führten. Die Autoren konnten 12 von 224 positiven ELISA-Ergebnissen im IFAT bestätigen, wobei dem ELISA aber eine weit höhere Sensibilität zugesprochen wurde. Auch die von uns untersuchten Schafseren aus Afrika wiesen zu einem hohen Prozentsatz diese Mängel in der Serumqualität auf. HAMDY und Mitarb. (1981) glauben, daß die Zuverlässigkeit des ELISA mit einer besseren Serumqualität ansteigt.

Berücksichtigt man nur die eindeutigen ELISA-Ergebnisse, dann erzielten wir übereinstimmende Ergebnisse in allen drei Verfahren letztlich in 294 Seren aus Kenya (66,5%). Von diesen wurden 217 Seren (50,8%) als positiv und 67 Seren (15,7%) als negativ beurteilt. Für die Zuverlässigkeit unserer Befunde spricht, daß mit den Methoden gleiche Tendenzen der Antikörperprävalenz in den drei Gebieten Kenyas nachweisbar sind. So wurden auch im ELISA, übereinstimmend mit den Befunden der beiden anderen Methoden, in den Seren aus Naivasha mehr positive Seren (95,4%) und höhere Antikörpertiter festgestellt als in Seren von der Farm Lewa Down bei Isiolo (55,0%) und von Molo/Grassland (41,2%).

Für die Spezifität der Verfahren spricht auch, daß die Antikörpertiter von Seren, die nur mit einer oder zwei Methoden positiv beurteilt wurden, immer an der unteren Sensibilitätsgrenze der Tests lagen. Diese Seren wiesen maximal Titer von 1:320 im ELISA, 1:128 (nur in einem Serum 1:256) in der IHA und 1:64 im IFAT auf.

Nach unseren Befunden sind Antikörper gegen das NSDV in Seren aus der Gegend von Naivasha viel weiter verbreitet. Diese Ergebnisse stimmen nach MEIER (1982) mit der Verbreitung von *Rhipicephalus appendiculatus* überein. Ähnliche Beobachtungen machte bereits JESSETT (1978), der zahlreiche Schaf- und Ziegenserum aus Tanzania mit der IHA auf NSDV-Antikörper untersuchte. Je nach Häufigkeit des Vektors reagierten 3,2 bis 29,2% der Seren aus einer Gegend positiv. DAVIES (1978) fand in Kenya ebenfalls eine Abhängigkeit des Antikörpervorkommens bei Schafen und Ziegen von der Verbreitung der Zecke. Bis zu 100% der Seren aus einem bestimmten Gebiet waren im IFAT positiv.

In 47 von 50 Schafserum aus der Republik Südafrika waren mit keinem Verfahren NSDV-Antikörper demonstrierbar. 3 Seren, die in IHA und IFAT ebenfalls negativ waren, wurden im ELISA mit einem Titer von 1:40 fraglich eingestuft. Als mögliche Ursache für diese Befunde erscheinen uns Kreuzreaktionen mit anderen Bunyaviren am wahrscheinlichsten.

Von den Humanserum reagierte nur eines (K.M.) im ELISA mit 1:80 schwach positiv (um eine Stufe höher als die anderen Seren); dasselbe Serum zeigte im IFAT einen Titer von 1:16 und in der IHA einen solchen von 1:128. Im IFAT lag dieser Titer um mindestens 2 Verdünnungsstufen, in der IHA um mindestens 4 Stufen über denjenigen der anderen Seren. Diese Ergebnisse erscheinen uns trotz der geringen Anzahl der Probanden bemerkenswert, weil eine Übereinstimmung in allen 3 Verfahren besteht. Wir vermuten eine nosokomiale, subklinisch abgelaufene Infektion bei K.M. infolge Ultraschallbehandlungen zur Antigenaufbereitung des ELISA. Das Vorkommen von NSDV-neutralisierenden Antikörpern beim Mensch ist bereits von WEINBREN (1959) beschrieben worden. Über einen klinischen Fall von NSD-Erkrankung bei einem Mann in Uganda berichteten KIRYA und Mitarb. (1972). Der NSD-Nachweis gelang in diesem Fall durch Serumverimpfung auf Saugmäuse und den Nachweis eines 4fachen KBR-Titeranstieges im Serum innerhalb von 48 Tagen.

Nach MEIER (1982) stellt der ELISA nicht nur bei vielen Virusinfektionen der Tiere generell, sondern auch zum Nachweis von NSDV-Antikörpern eine schnell und einfach durchführbare Methode dar. Aufgrund unserer vergleichenden Untersuchungen können wir dem zustimmen und feststellen, daß der ELISA bei einwandfrei positiven Seren mindestens ebenso sensibel ist wie die IHA und der IFAT. Er weist darüberhinaus einige arbeitstechnische Vorteile auf. Abgesehen von der Antigenaufbereitung, die wie bei der IHA aus infizierten Zellkulturen vorgenommen wird, steht die Durchführbarkeit des ELISA unter einfachen Laborbedingungen außer Zweifel. Die Antigenherstellung für den ELISA stellte sich jedoch weniger arbeits- und zeitaufwendig dar. Ein mit PEG angereichertes Antigen, wie es zur Sensibilisierung der Hammelerythrozyten in der IHA Verwendung fand, erwies sich im ELISA als nicht geeignet. Die Ablesung der Ergebnisse ist nicht zwingend photometrisch nötig, sondern auch mit bloßem Auge durchführbar. Gegenüber der IHA besteht weiterhin der Vorteil, daß eine Vorbehandlung der Seren nicht vorgenommen werden muß.

Problematisch erscheint uns die Beurteilung der Spezifität niedriger Reaktionen im ELISA. Diese spielen nach unseren Erfahrungen in der IHA und besonders im IFAT eine weniger große Rolle. Deshalb erscheint uns der IFAT dazu geeignet, zweifelhafte bzw. niedrig positive ELISA-Titer zu überprüfen. Für die Untersuchung einer größeren Anzahl von Seren empfehlen wir dagegen aufgrund der einfacheren und schnelleren Durchführbarkeit den ELISA und die IHA. Beide Verfahren beurteilen wir als gleich gut geeignet.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Literaturteil der Arbeit umfaßt einen Überblick über Möglichkeiten zur Serodiagnose der Nairobi Sheep Disease (NSD), die bisherigen Erfahrungen mit den dabei verwendeten Verfahren sowie eine Zusammenstellung von Arbeiten, in denen verschiedene Methoden gleichzeitig zum Nachweis von Antikörpern bei anderen Virusinfektionen der Tiere eingesetzt wurden.

Im experimentellen Teil wurden Seren von artifiziell mit NSD-Virus infizierten Kaninchen und Schafen sowie 477 Schafseren aus Kenya und der Republik Südafrika und 6 Humanserren vergleichend mit einer modifizierten indirekten Hämagglutination (IHA) und einem verbesserten indirekten Immu-
nofluoreszenzantikörpertest (IFAT) untersucht. Die Ergebnisse wurden in Bezug gebracht zu den mit einem indirekten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) beim gleichen Untersuchungsmaterial von MEIER (1982) erhobenen Befunden.

Bei Kaninchenserren waren über den gesamten Versuchszeitraum von 45 Wochen in der IHA Titer um 1:512 bzw. im IFAT um 1:256 festzustellen; die ELISA-
werte lagen teilweise darüber.

Bei experimentell infizierten Schafen konnten in der IHA ab dem 7. Tag p.i. und im IFAT ab dem 12. Tag p.i. Antikörper festgestellt werden. Die Titer stiegen bis auf 1:128 in der IHA und im IFAT, sie waren auch nach 33 Tagen p.i. (Versuchsende) noch vorhanden. Die im ELISA nachweisbaren Antikörper wiesen damit vergleichbare Titer bis 1:160 auf, doch zeigte der ELISA um mehrere Tage später als die IHA bzw. der IFAT positive Werte an.

In 427 Schafseren aus Kenya ergab der ELISA mehr positive Ergebnisse und höhere Antikörpertiter als die beiden anderen Methoden. Die höchsten ELISA-Titer waren 1:2560, in der IHA wurden maximale Titer von 1:1024 und im IFAT von 1:256 gemessen.

Obereinstimmend ist der Anteil positiv beurteilter Seren aus der Gegend von Naivasha am größten (95,4% im ELISA, 85,5% in der IHA und 83,6% im IFAT). Die entsprechenden Werte für Isiolo lauteten 55,0% im ELISA und 45,0% in der IHA bzw. im IFAT sowie für Molo/Grassland 41,2% im ELISA, 21,9% in der IHA und 19,3% im IFAT.

Diese Befunde könnten mit der Verbreitung der Zecke *Rhipicephalus appendiculatus* korreliert sein.

Keine Antikörper waren in 50 Seren aus der Kapprovinz in der Republik Südafrika festzustellen.

Aus den Titern bei einem der Humanseren wurde auf eine nosokomiale, subklinisch abgelaufene Infektion geschlossen, weil Vergleichsseren in allen drei Testverfahren negativ reagiert hatten.

Für seroepidemiologische Reihenuntersuchungen werden aus technischen Gründen die IHA und der ELISA, zur Abklärung schwach positiver Reagenten der IFAT als geeignet bezeichnet.

Th. Fritz

Demonstration of Antibodies to Nairobi Sheep Disease-Virus by Indirect Haemagglutination and Indirect Immunofluorescent Antibody Technique and Compared with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

SUMMARY

The first part of this thesis is a review dealing with the diagnosis of Nairobi sheep disease (NSD) by serological methods and present experiences with the applied techniques. Then a synopsis is given about published literature concerning the application of different serological methods for demonstration of antibodies in other virus diseases of domestic animals.

The second part describes experiences with the application of different methods to demonstrate antibodies against NSD-virus (NSDV). A modified indirect haemagglutination (IHA) and an improved indirect fluorescent antibody technique (IFAT) were used. Sera from rabbit and sheep, experimentally infected with NSDV as well as 477 sheep sera from Kenya and the Republic of South Africa and 6 human sera were investigated. The same material was tested by MEIER (1982) in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results of all three methods were compared.

In rabbit sera antibody titers up to 1:512 could be detected in IHA, and titers of about 1:256 in IFAT during the whole period of the investigations (45 weeks); ELISA titers were higher in some samples.

Antibodies in sera from experimentally infected sheep were found in IHA between 7 and 33 and in IFAT between 12 and 33 days p.i. (end of the experiment). Highest agglutination and fluorescent antibody titers were 1:128. ELISA titers were only slightly higher, but were detectable some days later p.i. than those of the IHA and IFAT.

In ELISA higher levels of antibodies were recorded in 427 sheep sera from Kenya than with both other methods with maximum titers of 1:2560. Those of the IHA were 1:1024 and the best fluorescent antibody levels were 1:256.

The highest prevalence of positive sera were found by all three methods in sera from the Naivasha area (95,4% ELISA, 85,5% IHA, 83,6% IFAT). The corresponding figures for sera from Isiolo were 55,0%, 45,0%, 45,0% and for sera from the Molo area 41,2%, 21,9% and 19,3%.

These results could be related to the distribution of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*.

No antibodies could be detected in 50 sheep sera from the Cape Province of the Republic of South Africa.

Only one human serum showed low levels of antibodies in all three tests. This might be the result of a nosocomial subclinical infection.

For technical reasons it is recommended to use the IHA and ELISA for seroepidemiological surveys and the IFAT to clear doubtful reactions.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ANSELL, R.H. (1957):

Attenuation of Nairobi sheep disease virus in the mouse brain
Vet. Rec. 69, 410 - 412

ASSAF, R., G. MARSOLAIS, P. MAROIS, P. PAYMENT (1975):

Correlation between the serum neutralization test and the
indirect immunofluorescent test for the detection of specific
antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus
Can. J. comp. Med. 39, 224 - 226

ATANASIU, P., P. PERRIN (1979):

Microméthode immunoenzymatique de titrage des anticorps
antirabiques: utilisation de la glycoprotéine rabique et de
la protéine A conjuguées à la peroxydase
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 130 A, 257 - 268

BEHRENS, F., R. ZIEGELMAIER, T. TOTH, M. v. KEYSERLINGK, E. FORSCHNER (1979):

Rinderleukose-Diagnostik: ELISA - ein neues Verfahren
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 429 - 432

BITSCH, V., M. ESKILDSEN (1976):

A comparative examination of swine sera for antibody to
Aujeszky virus with the conventional and a modified virus-serum
neutralization test and a modified direct complement fixation
test
Acta vet. scand. 17, 142 - 152

BLUE, J.L., D.L. DAWE, J.B. GRATZEK (1974):

The use of passive hemagglutination for the detection of
bluetongue viral antibodies
Amer. J. vet. Res. 35, 139 - 142

BOMMELI, W.R., U. KIHM, M. LAZAROWICZ, F. STECK (1980):

Rapid detection of antibodies to infectious bovine rhino-tracheitis (IBR) virus by micro enzyme linked immunosorbent assay (micro ELISA)

Proc. 2nd Int. Symp. Vet. Lab. Diagn., Luzern, Schweiz, 69, 235 - 239

BOULANGER, P., J.F. FRANK (1975):

Serological methods in the diagnosis of bluetongue

Austr. vet. J. 51, 185 - 189

BRIAIRE, J., R.H. MELOEN, S.J. BARTELING (1979):

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against Aujeszky's disease virus in pig sera

Zbl. Vet. Med. B, 26, 76 - 81

BORKI, F., M. SIBALIN (1972):

Conclusions and questions arising from a study of serology and immunology of equine influenza

Proc. 3rd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris, Frankreich, 510 - 526

CHRISTENSEN, L.R., S. WEISBROTH, B. MATANIC (1966):

Detection of ectromelia virus and ectromelia antibodies by immunofluorescence

Laboratory Animal Care 16, 129 - 141

COLLINS, M.J., R.L. PETERS, J.C. PARKER (1981):

Serological detection of ectromelia virus antibody

Lab. Anim. Sci. 31, 595 - 598

DAVIES, F.G. (1972):

Nairobi sheep disease (NSD)

East Afr. Vet. Res. Org., Muguga, Kenya

Ann. Rep., 15 - 17

DAVIES, F.G. (1978):

A survey of Nairobi sheep disease antibody in sheep and goats, wild ruminants and rodents within Kenya

J. Hyg., Camb. 81, 251 - 258

DAVIES, F.G., D.M. JESSETT, S. OTIENO (1976):

The antibody response of sheep following infection with Nairobi sheep disease virus

J. comp. Path. 86, 497 - 502

DAVIES, F.G., J. MUNGAI, T. SHAW (1974):

A Nairobi sheep disease vaccine

Vet. Rec. 94, 128

DAVIES, F.G., J. MUNGAI, M. TAYLOR (1977):

The laboratory diagnosis of Nairobi sheep disease

Trop. Anim. Hlth Prod. 9, 75 - 80

DAVIES, F.G., C. OTEMA (1978):

The antibody response in sheep infected with a Kenyan sheep and goat pox virus

J. comp. Path. 88, 205 - 210

DAVIES, F.G., S. OTIENO, D.M. JESSETT (1977):

The antibody response in sheep vaccinated with experimental Nairobi sheep disease vaccines

Trop. Anim. Hlth Prod. 9, 181 - 183

DESCOTEAUX, J.P., P. PAYMENT (1981):

Comparison of hemagglutination inhibition, serum neutralization and ELISA-PVM tests for the detection of antibodies to pneumonia virus of mice in rat sera

J. virol. Meth. 3, 83 - 87

EDELSTEN, R.M. (1975):

The distribution and prevalence of Nairobi sheep disease and other tick-borne infections of sheep and goats in northern Somalia

Trop. Anim. Hlth Prod. 7, 29 - 34

ELLENS, D.J., P.W. DE LEEUW, P.J. STRAVER (1978):

The detection of rotavirus specific antibody in colostrum and milk by ELISA

Ann. Rech. Vet. 9, 337 - 342

ESKILDSSEN, M., E. OVERBY (1976):

Serological diagnosis of classical swine fever. A comparison of a modified direct complement fixation test with an immunofluorescence plaque neutralization test in the diagnosis of experimental subclinical infection

Acta vet. scand. 17, 131 - 141

ESPOSITO, J.J., J.F. OBIJESKI, J.H. NAKANO (1977):

Serological relatedness of monkeypox, variola, and vaccinia viruses

J. med. Virol. 1, 35 - 47

FORSCHNER, E., H.D. DOPATKA, J. BUNGER, F. BEHRENS, K.H. WITTE (1981):

Aujeszkysche Krankheit der Schweine: Zur Einsatzmöglichkeit eines ELISAs für den Nachweis von virusspezifischen Serumantikörpern

Dtsch. tierärztl. Wschr. 88, 134 - 139

GISPEN, R., B. BRAND-SAATHOF, A.C. HEKKER (1976):

Monkeypox-specific antibodies in human and simian sera from the Ivory coast and Nigeria

Bull. Wld. Hlth Org. 53, 355 - 360

- GOLDING, S.M., R.S. HEDGER, P. TALBOT, J. WATSON (1976):
Radial immuno-diffusion and serum-neutralization techniques
for the assay of antibodies to swine vesicular disease
Res. vet. Sci. 20, 142 - 147
- GUILLEMIN, F., G. TIXIER, J.P. SOULEBOT, G. CHAPPUIS (1981a):
Comparaison de deux méthodes de titrages des anticorps
antirabiques neutralisants
J. Biol. Standard. 9, 147 - 156
- GUILLEMIN, F., G. TIXIER, J.P. SOULEBOT, G. CHAPPUIS (1981b):
Resultats comparés des titrages des anticorps antirabiques
par deux méthodes utilisant l'immunofluorescence
J. Biol. Standard. 9, 157 - 161
- GUTEKUNST, D.E., W.A. MALMQUIST (1964):
Complement-fixing and neutralizing antibody response to
bovine viral diarrhea and hog cholera antigens
Can. J. comp. Med. 28, 19 - 23
- GUTEKUNST, D.E., E.C. PIRTLE, W.L. MENGELING (1978):
Development and evaluation of a microimmunodiffusion test
for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine
serum
Amer. J. vet. Res. 39, 207 - 210
- HAMDY, F.M., G.S. COLGROVE, E.M. DE RODRIGUEZ, M.L. SNYDER,
W.C. STEWART (1981):
Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for
detection of antibody to african swine fever virus
Amer. J. vet. Res. 42, 1441 - 1443

HAMDY, F.M., A.H. DARDIRI (1979):

Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of
african swine fever

Vet. Rec. 105, 445 - 446

HAMDY, F.M., A.H. DARDIRI (1980):

Detection of antibody to african swine fever virus by
enzyme-linked immunosorbent assay

Proc. 2nd Int. Symp. Vet. Lab. Diagn., Luzern, Schweiz,
70, 240 - 243

HAZRATI, A., H. MIRCHAMSY, S. BAHRAMI (1972):

Comparative studies on the serological responses of horses
to african horsesickness virus

Proc. 3rd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris,
Frankreich, 69 - 80

HERBERT, W.J. (1978):

Passive haemagglutination

in: WEIR, D.M.

Handbook of experimental immunology, 3rd Ed.

Blackwell scientific publications

Oxford, London, Edinburgh, Melbourne

HERRING, A.J., P.F. NETTLETON, C. BURRELLS (1980):

A micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection
of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus

Vet. Rec. 107, 155 - 156

HINAIDY, B. (1980):

Serodiagnostische Nachweisverfahren boviner Parvoviren

Zbl. Vet. Med. B, 27, 459 - 469

- HORTIG, H., B. RÜDER, R. BRUSKE (1980):
Vergleichende Untersuchungen zur Verwendbarkeit des Mikro-
neutralisationstests, des indirekten Immunofluoreszenztests
und des Virus-Inhibitionstests zum Nachweis von Antikörpern
gegen das Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGE) des
Schweines
Dtsch. tierärztl. Wschr. 87, 192 - 196
- HOUWERS, D.J., A.L.U. GIELKENS (1979):
An ELISA for the detection of maedi / visna antibody
Vet. Rec. 104, 611
- HUCK, R.A., D.H. EVANS, D.G. WOODS, A.A. KING, P. STUART (1975):
Border disease of sheep. Comparison of the results of
serological testing using complement fixation, immuno-
diffusion, neutralization and immunofluorescent techniques
Br. vet. J. 131, 427 - 435
- JESSETT, D.M. (1978):
Serological evidence of Nairobi sheep disease in Tanzania
Trop. Anim. Hlth Prod. 10, 99 - 100
- JESSETT, D.M., F.G. DAVIES, M.M. RWEYEMAMU (1976):
An indirect haemagglutination test for the detection of
antibody to Nairobi sheep disease virus
Res. vet. Sci. 20, 276 - 280
- KARBER, G. (1931):
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer
Reihenversuche
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480 - 483
- KIRYA, G.B., P.M. TUKEI, M. LULE, E. MUJOMBA (1972):
Parasitoses of man and animals in africa. NSD in man
Proc. Ann. Sci. Conf. E. Afr. Med. Res. Counc.,
Dar es Salaam, 6, 283 - 287

KODAMA, Y., M. OGATA, Y. SHIMIZU (1981):

Serum immunoglobulin A antibody response in swine infected with transmissible gastroenteritis virus, as determined by indirect immunoperoxidase antibody test

Amer. J. vet. Res. 42, 437 - 443

KONO, Y. (1972):

Development of immunity after immunization and infection with avirulent, attenuated and virulent equine infectious anemia viruses

Proc. 3rd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris, Frankreich, 242 - 254

LODETTI, E., F. DE SIMONE, L. NARDELLI (1972):

Neutralization tests for foot-and-mouth disease, equine rhino-, porcine entero-, Aujeszky- and rhinopneumonitis viruses

Zbl. Vet. Med. B, 19, 848 - 857

LUGOVIC, B., S. CVETNIC (1980):

Use of indirect hemagglutination (IHA) test in serum antibody titration of infectious bovine rhinotracheitis

Proc. 2nd Int. Symp. Vet. Lab. Diagn., Luzern, Schweiz, 13, 42 - 45

MANNING, J.S., M.F. CHEN (1980):

Bluetongue virus: Detection of antiviral immunoglobulin G by means of enzyme-linked immunosorbent assay

Curr. Microbiol. 4, 381 - 385

MANZ, D. (1981):

Die Milch als Untersuchungsmaterial für die Diagnostik der enzootischen Leukose des Rindes

Dtsch. tierärztl. Wschr. 88, 169 - 171

- MANZ, D., D. WIEGAND, F. BEHRENS, R. ZIEGELMAIER (1981):
Vergleichende serologische Untersuchungen an Blut und
Milch zur Diagnostik der enzootischen Leukose des Rindes
Zbl. Vet. Med. B, 28, 280 - 291
- MARENNIKOVA, S.S., N.N. MALCEVA, N.A. HABAHASEVA (1981):
ELISA - a simple test for detecting and differentiating
antibodies to closely related orthopoxviruses
Bull. Wld. Hlth Org. 59, 365 - 369
- MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN (1977):
Virologische Arbeitsmethoden, Band II
G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- MEIER, K. (1982):
Ein indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
zum Nachweis von Antikörpern gegen Nairobi Sheep Disease-
Virus
Vet. Med. Diss., Univ. München in Vorbereitung
- MOENNIG, V., P. WOLDESENBET, H.-R. FREY, B. LIESS, H.D. DOPATKA,
F. BEHRENS (1981):
Vergleichende Untersuchungen von Schweineseren mit einem
Enzym-Immuntest (ELISA) und dem Neutralisationstest zur
serologischen Diagnose bei der Aujeszky'schen Krankheit
des Schweines
Dtsch. tierärztl. Wschr. 88, 357 - 359
- MOSER, S. (1971):
Serologische Untersuchungen über das Vorkommen von Influenza
A2/Hongkong-Infektionen bei Schweinen in Bayern
Vet. Med. Diss., Univ. München

MOUTOU, F., B. TOMA, B. FORTIER (1978):

Application of an enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of Aujeszky's disease in swine

Vet. Rec. 103, 264

MUNDERLOH, U. (1977):

Die Nairobi Sheep Disease - eine synoptische Darstellung der Erkrankung sowie Untersuchungen zum Verhalten des Erregers in vivo und in vitro

Vet. Med. Diss., Univ. München

NAKAJIMA, H. (1972):

Immunodiffusion studies in equine infectious anemia and their evaluation for diagnosis

Proc. 3rd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris, Frankreich, 199 - 214

NOON, K.F., M. ROGUL, L.N. BINN, T.J. KEEFE, R.H. MARCHWICKI, M.J. APPEL (1980):

Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus

Amer. J. vet. Res. 41, 605 - 609

NOON, K.F., M. ROGUL, L.N. BINN, T.J. KEEFE, R.H. MARCHWICKI, R. THOMAS, B.T. DE CICCO (1979):

An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine antibodies to canine adenoviruses

Lab. Anim. Sci. 29, 603 - 609

OHDER, H., L.J. LUND, A.P. WHITELAND (1970):

Observations on the growth and development of bluetongue, Nairobi sheep disease and Rift valley fever viruses by fluorescent antibody technique and titration in a tissue culture system

Arch. ges. Virusforsch. 29, 127 - 138

- OSTERHAUS, A., A. KROON, R. WIRAHADIREDDA (1979):
ELISA for the serology of FIP virus
Vet. Quarterly 1, 59 - 62
- PAN, I.C., R. TRAUTMAN, W.R. HESS, C.J. DE BOER, J. TESSLER, A. ORDAS,
C. SANCHEZ BOTIJA, J. OVEJERO, M.C. SANCHEZ (1974):
African swine fever: Comparison of four serotests on porcine
serums in Spain
Amer. J. vet. Res. 35, 787 - 790
- PAYMENT, P., R. ASSAF, M. TRUDEL, P. MAROIS (1979):
Enzyme-linked immunosorbent assay for serology of infectious
bovine rhinotracheitis virus infections
J. clin. Microbiol. 10, 633 - 636
- PEREIRA, H.G., L. ROWE, D. BABER (1976):
Use of double immuno-diffusion (Ouchterlony) test for the
diagnosis of swine vesicular disease
Res. vet. Sci. 20, 139 - 141
- PETZOLDT, K., L. LINDEMANN, H. MERKT (1966):
Serologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern des
Rhinopneumonitis-Virus in Pferdezuchtbeständen
Dtsch. tierärztl. Wschr. 73, 536 - 539
- PINI, A., H. OHDER, A.P. WHITELAND, L.J. LUND (1968):
Studies on the fluorescent and neutralizing antibodies to
bluetongue virus in sheep
Arch. ges. Virusforsch. 25, 129 - 136

POLI, G., J. STOTT, Y.S. LIU, J.S. MANNING (1982):

Bluetongue virus: Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, immunodiffusion, and serum neutralization for detection of viral antibodies

J. clin. Microbiol. 15, 159 - 162

PRAGER, D., K.H. WITTE (1981):

Die serologische Diagnose der Epizootischen Virusdiarrhoe (EVD) des Schweines mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik (IIFT).

I. Einfluß verschiedener Parameter auf den Antikörpertiter
Tierärztl. Umschau 36, 404 - 414

RAI, A., D.K. LAHIRI (1981):

A micro-enzyme-labelled immunosorbent assay (microelisa) for the detection of foot-and-mouth disease virus antigen and antibody

Acta virol. 25, 49 - 52

REHMAN, S. ur (1972):

Direkte Immunofluoreszenz zum Nachweis der Lymphocytären Choriomeningitis (LCM)

Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 276 - 280

REHMAN, S. ur, G. WAGNER (1972):

Untersuchungen zur Routinediagnostik der Lymphocytären Choriomeningitis beim Goldhamster

Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 337 - 342

RESSANG, A.A., J.G. VAN BEKKUM (1972):

The indirect fluorescent antibody technique as a method for detecting serum antibodies against hog cholera.

Part II: Its further evaluation by a comparative assay with three other serological tests

Zbl. Vet. Med. B, 19, 753 - 763

ROHDE, W., E. KARASEK (1970):

Zur Serodiagnostik der Ektromelie bei Versuchsmäusen

Arch. exp. Vet. Med. 24, 655 - 660

ROSSITER, P.B. (1980):

A comparison of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for use in the study of malignant catarrhal fever

Bull. Anim. Hlth Prod. Afr. 28, 109 - 114

ROSSITER, P.B. (1981):

Immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for detecting antibodies to malignant catarrhal fever in infected cattle

Trop. Anim. Hlth Prod. 13, 189 - 192

ROSSITER, P.B., D.M. JESSETT, P. HOLMES (1981):

Microelisa test for detecting antibodies to rinderpest virus antigens

Trop. Anim. Hlth Prod. 13, 113 - 116

RUCKERBAUER, G.M., A. GIRARD, G.L. BANNISTER, P. BOULANGER (1971):

Studies on bovine virus diarrhoea: Serum neutralization, complement-fixation, and immunofluorescence

Can. J. comp. Med. 35, 230 - 238

SAUNDERS, G.C. (1977):

Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for the rapid detection of hog cholera antibodies

Amer. J. vet. Res. 38, 21 - 25

SAUNDERS, G.C., M.E. WILDER (1974):

Disease screening with enzyme-labeled antibodies

J. infect. Dis. 129, 362 - 364

SKODA, R., J. JAKUBIK (1972):

Komplementbindungsreaktion bei der Aujeszkyschen Krankheit
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 85, 387 - 392

STORZ, J., R. ROTT (1980):

Ober die Verbreitung der Coronavirusinfektion bei Rindern in
ausgewählten Gebieten Deutschlands: Antikörpernachweis durch
Mikroimmundiffusion und Neutralisation
Dtsch. tierärztl. Wschr. 87, 252 - 254

STUKER, G., N.J. SCHMIDT, B. FORGHANI, C.A. HOLMBERG, R.V. HENRICKSON,
J.H. ANDERSON (1979):

Rotavirus antibody assays on monkey sera: A comparison of
enzyme immunoassay with neutralization and complement-fixation
tests
Amer. J. vet. Res. 40, 1620 - 1623

TERPSTRA, C. (1969):

Nairobi sheep disease-studies on virus properties, epizootiology
and vaccination in Uganda
Diss., Univ. Utrecht

TERPSTRA, C., M.J.M. TIELEN (1976):

Antibody response against swine fever following vaccination
with C-strain virus
Zbl. Vet. Med. B, 23, 809 - 821

THOMAS, F.C., A. GIRARD, P. BOULANGER, G. RUCKERBAUER (1976):

A comparison of some serological tests for bluetongue virus
infection
Can. J. comp. Med. 40, 291 - 297

- TRIPATHY, D.N., L.E. HANSON, A.H. KILLINGER (1973):
Studies on differentiation of avian pox viruses
Avian Dis. 17, 325 - 333
- UPPAL, P.K., P.R. NILAKANTAN (1970):
Studies on the serological relationships between avian pox,
goat pox and vaccinia viruses
J. Hyg., Camb. 68, 349 - 358
- WALZEL, L. (1980):
Vergleichende Untersuchungen über die serologische Diagnostik
der infektiösen Anämie der Einhufer
Vet. Med. Diss., Univ. Hannover
- WARDLEY, R.C., E.M.E. ABU ELZEIN, J.R. CROWTHER, P.J. WILKINSON (1979):
A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for the
detection of african swine fever virus antigen and antibody
J. Hyg., Camb. 83, 363 - 369
- WEINBREN, M.P. (1959):
Virus neutralizing antibodies in human sera from east africa
E. Afr. Virus Res. Inst., Ann. Rep. 9, 12 - 15
- WEINBREN, M.P., R.N. GOURLAY, W.H.R. LUMSDEN, B.M. WEINBREN (1958):
An epizootic of Nairobi sheep disease in Uganda
J. comp. Path. 68, 174 - 187
- WENNER, H.A., F.D. MACASAET, P.S. KAMITSUKA, P. KIDD (1968):
Monkey Pox.
I. Clinical, virologic and immunologic studies
Amer. J. Epidemiol. 87, 551 - 566

WIRAHADIREDDA, R.M.S., P.R. RONDHUIS (1976):

A comparative study of the neutralisation test and the indirect fluorescent antibody technique for the detection of antibodies to the virus of Aujeszky in pig sera

Tijdschr. Diergeneesk. 101, 1125 - 1128

WOLFE, L.G., A. ADLER, R.A. GRIESEMER (1968):

Immunologic response of monkeys to aerosols of Yaba virus

J. Natl. Cancer Inst. 41, 1197 - 1203

ZYAMBO, G.C.N., P.J. ALLAN, D.P. DENNETT, R.H. JOHNSON (1973):

A passive haemagglutination test for the demonstration of antibody to infectious bovine rhinotracheitis / infectious pustular vulvovaginitis virus.

2. Studies on antibody incidence and the serological response after infection

Austr. vet. J. 49, 413 - 417

LEBENS LAUF

Geburt: 8.12.1954 in Mannheim

Eltern: Walter Ernst Fritz
Anneliese Klara Fritz, geb. David

Schule: April 1961 bis April 1965:
Diesterweg-Volksschule Mannheim
April 1965 bis Juni 1973:
Karl-Friedrich-Gymnasium Mannheim

Abitur: 27.6.1973

Wehrdienst: Oktober 1973 bis Dezember 1974

Studium der Veterinärmedizin: April 1975 bis Dezember 1980 an der
Freien Universität Berlin

Tierärztliche Prüfung: 17.12.1980

Approbation als Tierarzt: 19.12.1980

Dissertation: seit Januar 1981 im Institut für
Vergleichende Tropenmedizin und
Parasitologie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Für die Übergabe des Themas, die wissenschaftliche Beratung und die Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung der Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. E. Munz.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn M. Reimann für die jederzeit gern gewährte Unterstützung.

